



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

**“Métodos analíticos verdes aplicados al análisis de  
especies químicas de relevancia ambiental”**

Lic. Maira D. Carabajal

Directora: Dra. Graciela M. Escandar  
Co-director: Dr. Juan A. Arancibia

Rosario, Argentina  
2019

# **“Métodos analíticos verdes aplicados al análisis de especies químicas de relevancia ambiental”**

Maira Daniela Carabajal

Licenciada en Química

Universidad Nacional de Rosario

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar por el grado académico de Doctora en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Rosario, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en ésta, u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Química de Rosario, en el Departamento de Química Analítica, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre abril de 2015 y enero de 2019, bajo la dirección de la Dra. Graciela M. Escandar y la co-dirección del Dr. Juan A. Arancibia.

# Agradecimientos

La tesis presente indica el final de una etapa de mi vida, la cual estuvo llena de alegrías y algunas tristezas, en donde a nivel personal y profesional superé importantes inconvenientes, creciendo como persona.

En primer lugar quiero agradecer al de arriba. Luego a mi familia de la cual aprendí el valor del trabajo duro y la honestidad, a mi mamá Graciela que me enseñó el valor de la palabra, a mi papá Daniel quien me mostró el valor de la sonrisa, a mi hermano Alejandro que siempre estuvo para mí, y a mi abuela Tita que amo con todo el corazón.

Esta tesis representa un arduo esfuerzo realizado por nuestro grupo de trabajo, por lo cual no puedo dejar de agradecer a mi directora Graciela Escandar, quien en su exigencia y dulzura de madre me enseñó, no solo en el laboratorio sino también en la vida. A mi coo, Juan Arancibia que siempre estuvo tanto en la mesada a la par conmigo como para dar buenos consejos.

A personas maravillosas que forman parte de la cátedra de química analítica, Alejandro Olivieri un gran líder y profesor, a Gabriela Ibañez excelente docente y marcadora de tendencias.

A mis compañeros del doctorado, mi coequiper Ariana Pagani, Alejandra Glorio y Franco Allegrini que hicieron que el día a día en el laboratorio sea una fiesta llena de risas. Compartir esta etapa con Alejandro Ferri, Claudia Lagier, Pablo Pizano, Alejandro Garcia Reiriz, Valeria Lozano, Santiago Bortolato y Patricia Damiani fue un placer.

A mis compañeros de la cátedra de bromatología, que me dieron la oportunidad de enseñar y proporcionaron buenos consejos, Roxana Verdini, Marina Soazo, Gisela Piccirilli, Daniel Elias. También al Dr. Guillermo Labadié y su grupo de trabajo.

A mis amigos Andrés, Gabriela, Constanza, Jaquelina, Noelia, Pablo, Wallace y Lucy Mary que me acompañaron fielmente.

En especial a una persona a quién quiero mucho, que me enseñó y me va a seguir enseñando sobre química analítica entre otras cosas, mi amiga Rocío Pellegrino.

Por último las personas que no están pero dejaron una huella en mi vida a mi abuelos Pedro y Nelly, y a mi madrina Sonia.

## Publicaciones en revistas científicas

“A green-analytical chemistry method for agrochemical-residue analysis in vegetables”. M. D. Carabajal, J. A. Arancibia, G. M. Escandar, *Microchemical Journal* 128 (2016) 34-41.

“Excitation-emission fluorescence-kinetic third-order/four-way data obtained by Fenton degradation. Determination of heavy-polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of fluorescent interferents by four-way parallel factor analysis”. M. D. Carabajal, J. A. Arancibia, G. M. Escandar, *Talanta* 165 (2017) 52-63.

“On-line generation of third-order liquid chromatography–excitation-emission fluorescence matrix data. Quantitation of heavy-polycyclic aromatic hydrocarbons”. M. D. Carabajal, J. A. Arancibia, G. M. Escandar, *Journal of Chromatography A* 1527 (2017) 61-69.

“Multivariate curve resolution strategy for non-quadrilinear type 4 third-order/four-way liquid chromatography-excitation-emission fluorescence matrix data”. M. D. Carabajal, J. A. Arancibia, G. M. Escandar, *Talanta* 189 (2018) 509-516.

“Excitation-emission fluorescence-kinetic third-order/four-way data: Determination of bisphenol A and nonylphenol in food-contact plastics” M. D. Carabajal, J. A. Arancibia, G. M. Escandar, *Talanta* 197 (2019) 348-355.

## Presentaciones a congresos

“Modelado quimiométrico de datos cromatográficos de segundo orden con detección mixta. Aplicación al análisis de agroquímicos”. Maira D. Carabajal, Juan A. Arancibia y Escandar Graciela. 8° Congreso Argentino de Química Analítica- La Plata, Argentina. 2-6/11/2015. Premio Mejor Póster (Área Quimiometría).

“Desarrollo de métodos analíticos verdes: cromatografía líquida asociada a análisis quimiométrico de datos de segundo orden para la determinación de compuestos de interés ambiental”. Maira D. Carabajal, Rocío B. Pellegrino Vidal, Juan A. Arancibia, Gabriela Ibañez y Graciela Escandar. 4° Taller Argentino de Ciencias Ambientales- Capital Federal, Argentina. 18-20/05/2016.

“Liquid Chromatography with multivariate detection and chemometrics data processing: a basis for green-analytical methods”. Rocío B. Pellegrino Vidal, Maira D. Carabajal, Gabriela Ibañez, Juan A. Arancibia, Graciela Escandar. XVI Chemometrics in Analytical Chemistry- Barcelona, España, 06-10/06/2016.

“Determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en aguas naturales utilizando calibración multivía de tercer orden” Maira D. Carabajal, Juan A. Arancibia y Graciela Escandar. 8° Congreso Argentino de Química Analítica- Río Cuarto, Argentina. 11/2017. Presentación Oral.

“Datos del tercer orden/4 vías para el desarrollo de metodos analiticos verdes”. Maira D. Carabajal, Rocío B. Pellegrino Vidal, Gabriela Ibañez, Juan A. Arancibia, Graciela Escandar en el XIII Simposio Latinoamericano de Química Analítica y Ambiental (XIII LASEAC) y XIV Encuentro de Química Analítica y Ambiental (XIV EQAA)- La Serena, Chile, 12-15/11/2018.

# Índice

Índice .....	1
Índice de Tablas .....	5
Índice de Figuras .....	7
Abreviaturas.....	13
1 Introducción.....	17
1.1 Contaminantes ambientales .....	17
1.1.1 Agroquímicos .....	19
<i>Agroquímicos investigados</i> .....	21
1.1.2 Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs).....	23
<i>HPAs seleccionados</i> .....	23
1.1.3 Disruptores endócrinos (DEs).....	25
<i>DEs investigados</i> .....	26
1.2 Determinación de contaminantes orgánicos en muestras ambientales y alimenticias.....	27
1.3 Métodos basados en química analítica verde .....	28
1.4 Análisis quimiométrico de los datos .....	30
1.4.1 Datos cromatográficos de segundo orden.....	33
<i>MCR-ALS: datos de segundo orden/tres vías</i> .....	34
1.4.2 Datos cromatográficos de tercer orden .....	36
<i>Datos CL-MEEF cuadrilineales</i> .....	38
<i>PARAFAC de cuatro vías</i> .....	38
<i>Datos CL-MEEF no-cuadrilineales tipo 1</i> .....	41
<i>Datos CL-MEEF no-cuadrilineales tipo 4</i> .....	42
1.4.3 Datos cinético-espectroscópicos de tercer orden (C-MEEFs).....	44
<i>PARAFAC de cuatro vías</i> .....	44
<i>MCR-ALS: datos de tercer orden/cuatro vías</i> .....	45
<i>U-PLS/RTL</i> .....	45
2 Objetivos.....	48
2.1 Objetivos generales.....	48
2.2 Objetivos específicos .....	48

3 Sección experimental.....	51
3.1 Reactivos.....	51
3.2 Soluciones patrón.....	52
3.3 Soluciones de trabajo .....	52
3.4 Instrumental .....	53
3.5 Software .....	53
3.6 Determinación cromatográfica de agroquímicos con calibración de segundo orden.....	54
3.6.1 Procedimiento cromatográfico.....	54
3.6.2 Adquisición datos de segundo orden/tres vías.....	54
3.6.3 Muestras de calibración y validación .....	55
3.6.4 Muestras reales .....	56
3.7 Determinación cromatográfica de HPAs con calibración de tercer orden (datos cuadrilineales).....	57
3.7.1 Equipamiento .....	57
3.7.2 Adquisición de datos de tercer orden/cuatro vías .....	58
3.7.3 Muestras de calibración y validación .....	58
3.7.4 Muestras de aguas.....	60
3.8 Determinación cromatográfica de HPAs con calibración de tercer orden (datos no cuadrilineales).....	61
3.8.1 Equipamiento .....	61
3.8.2 Adquisición de datos de tercer orden/cuatro vías .....	61
3.8.3 Muestras de calibración y validación .....	62
3.8.4 Muestras de té .....	63
3.8.5 Método de referencia .....	64
3.9 Determinación de HPAs con calibración de tercer orden utilizando degradación de Fenton.....	64
3.9.1 Adquisición de datos de tercer orden/cuatro vías .....	64
3.9.2 Muestras de calibración y validación .....	65
3.9.3 Muestras de aguas.....	67
3.9.4 Medidas analíticas .....	68

3.10 Determinación de DEs con calibración de tercer orden utilizando degradación de Fenton.....	68
3.10.1 Adquisición de datos de tercer orden/cuatro vías .....	68
3.10.2 Muestras de calibración y validación .....	69
3.10.3 Muestras de plásticos .....	70
3.10.4 Método de referencia .....	71
3.10.5 Medidas analíticas .....	71
4 Resultados y discusión .....	74
4.1 Método analítico verde aplicado a la determinación de residuos de agroquímicos en muestras vegetales .....	74
4.1.1 Consideraciones generales.....	75
4.1.2 Matrices tiempo de elución-DAD.....	78
4.1.3 Matrices tiempo de elución-DFL.....	82
4.1.4 Muestra reales .....	85
4.1.5 Conclusiones parciales.....	89
4.2 Generación en línea de datos de tercer orden/cuatro vías CL-MEEFs. Aplicación a la cuantificación de hidrocarburos policíclicos aromáticos. ....	90
4.2.1 Datos de tercer orden CL-MEEFs obtenidos en línea .....	91
4.2.2 Sistema de HPAs en estudio .....	94
4.2.3 Teorema de Kruskal y su generalización.....	96
4.2.4 Muestras de validación .....	97
4.2.5 Muestras reales .....	103
4.2.6 Conclusiones parciales.....	106
4.3Aplicación del modelo MCR-ALS a datos de tercer orden/cuatro vías CL-MEEFs no cuadrilineales generados en línea. Cuantificación de HPAs en muestras de té. ....	107
4.3.1 Consideraciones generales del sistema estudiado .....	108
4.3.2 Modelado con MCR-ALS: muestras de validación.....	112
4.3.3 Muestras con potenciales interferencias .....	116
4.3.4 Muestras de té .....	118
4.3.5 Conclusiones parciales.....	119



4.4 Generación de datos de tercer orden/cuatro vías C-MEEFs a través de la degradación de Fenton. Determinación de HPAs en muestras ambientales.....	120
4.4.1 Degradación de HPAs con reacción de Fenton .....	121
4.4.2 Datos de tercer orden C-MEEFs.....	124
4.4.3 Muestras de validación .....	126
4.4.4 Conjunto de prueba N° 1.....	132
4.4.5 Conjunto de prueba N° 2.....	135
4.4.6 Muestras reales .....	138
4.4.7 Conclusiones parciales.....	141
4.5 Modelado de datos de tercer orden/cuatro vías C-MEEFs para la determinación de nonilfenol y bisfenol A en diversas muestras de plásticos. ....	142
4.5.1 Degradación de BPA y NF con la reacción de Fenton .....	143
4.5.2 Calibración de tercer orden/cuatro vías. ....	144
4.5.3 Análisis utilizando PARAFAC de cuatro vías .....	147
4.5.4 Análisis con U-PLS .....	150
4.5.5 Análisis con MCR-ALS.....	151
4.5.6 Muestras reales .....	153
4.5.7 Conclusiones parciales.....	156
5 Conclusiones.....	158
6 Resumen .....	162
7 Referencias .....	169

# Índice de Tablas

<b>Tabla 1:</b> Agroquímicos investigados.....	22
<b>Tabla 2:</b> Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs).....	24
<b>Tabla 3:</b> Disruptores endócrinos investigados.....	26
<b>Tabla 4:</b> Concentraciones de calibración de diez agroquímicos .....	55
<b>Tabla 5:</b> Niveles máximos de residuos (MRL) de los agroquímicos en alimentos.....	57
<b>Tabla 6:</b> Concentraciones de calibración para el sistema de HPAs .....	59
<b>Tabla 7:</b> Concentraciones de calibración de HPAs .....	62
<b>Tabla 8:</b> Concentraciones de calibración de HPAs. ....	65
<b>Tabla 9:</b> Concentraciones de calibración de DEs .....	70
<b>Tabla 10:</b> Familias químicas, funciones y constantes de disociación de agroquímicos... ..	76
<b>Tabla 11:</b> Resultados estadísticos para los agroquímicos en las muestras de validación determinados con DAD y DFL.....	82
<b>Tabla 12:</b> Recuperación de analitos en muestras reales adicionadas utilizando DAD y DFL.....	88
<b>Tabla 13:</b> Resultados estadísticos para el conjunto de HPAs en muestras de validación y muestras de prueba con el agregado de interferentes. ....	99
<b>Tabla 14:</b> Recuperaciones de HPAs en muestras de aguas enriquecidas. ....	105
<b>Tabla 15:</b> Resultados estadísticos para el conjunto de HPAs en muestras de validación y muestras de prueba con el agregado de interferentes. ....	115
<b>Tabla 16:</b> Concentraciones de HPAs en variedades de té .....	118
<b>Tabla 17:</b> Condiciones experimentales seleccionadas para la reacción de Fenton. ....	124
<b>Tabla 18:</b> Resultados estadísticos del conjunto de HPAs en muestras de validación utilizando datos C-MEEF y MEEF. ....	131
<b>Tabla 19:</b> Recuperaciones de los cinco HPAs en muestras de aguas adicionadas en presencia de potenciales interferentes utilizando calibración de cuatro vías.....	140
<b>Tabla 20:</b> Condiciones experimentales para la reacción de Fenton .....	144

<b>Tabla 21:</b> Resultados estadísticos para BPA y NF en muestras de validación utilizando calibración de tres y cuatro vías aplicando los algoritmos indicados.....	150
<b>Tabla 22:</b> Determinación de BPA y NF en diversos plásticos .....	154

# Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Criterios de clasificación de agroquímicos. ....	20
<b>Figura 2.</b> Clasificación de disruptores endócrinos.....	26
<b>Figura 3.</b> Estructura de $\beta$ -CD y unidad de glucopiranososa con los posibles sustituyentes. ....	30
<b>Figura 4.</b> Representación del orden de los datos y sus calibraciones asociadas.....	32
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de la aplicación de MCR-ALS a datos cromatográfico-espectrales de segundo orden. ....	34
<b>Figura 6.</b> Esquema ilustrativo del procesamiento por MCR-ALS de datos no- cuadrilineales tipo 4. Izq.: se construye la matriz súper aumentada de las muestras utilizando como modo común al modo emisión y se coloca de manera desplegada el modo tiempo de elución-excitación a lo largo de la dirección aumentada. Der.: MCR-ALS descompone a la matriz súper aumentada en espectros de emisión y en perfiles desplegados tiempo de elución-excitación para los componentes en todas las muestras (en el ejemplo la muestra la solución incógnita y dos muestras de calibración). Para cada muestra, los perfiles de los componentes en el modo aumentado, se desdoblan en perfiles separados de tiempo de elución y excitación, pudiendo identificar así a cada componente. ....	44
<b>Figura 7.</b> Gráficos tridimensionales DAD y DFL. Para una mejor visualización se divide el gráfico FDL en dos partes. ....	77
<b>Figura 8.</b> Perfiles temporales y espectrales de los analitos obtenidos experimentalmente por DAD (A) y modelados por MCR-ALS (B) para una muestra de validación.. ....	79
<b>Figura 9.</b> Gráfico de concentraciones predichas vs nominales de DICAMBA (marrón), CBL (azul), NAF (verde), IMZQ (violeta), NFZ (rosa), METIOCARB (naranja) y FM (gris) en muestras de validación utilizando DAD. El recuadro interno muestra las regiones elípticas de confianza conjunta.....	81

- Figura 10.** Perfiles cromatográficos y espectrales de los analitos obtenidos de manera experimental (A) y modelados por MCR-ALS (B) para una muestra de validación ..... 83
- Figura 11.** Perfiles espectrales de los analitos fluorescentes. Las líneas punteadas indican las longitudes de onda de excitación utilizadas ..... 84
- Figura 12.** Gráfico de concentraciones predichas vs nominales de CBZ (verde claro), CBL (azul), TBZ (negro), FBZ (rojo) y NAF (verde oscuro) en muestras de validación utilizando DFL. El recuadro muestra las regiones elípticas de confianza conjunta para las correspondientes rectas de regresión. .... 85
- Figura 13.** Gráfico de contorno CL-DAD y CL-DFL de una muestra de calibración y muestra real de hongo y pepino sin el agregado de los analitos. Las líneas blancas señalan el cambio en la longitud de onda de excitación. .... 86
- Figura 14.** Representación de los valores predichos versus valores nominales de los analitos en todas las muestras reales. El recuadro interno muestra la correspondiente región elíptica de confianza conjunta. .... 87
- Figura 15.** Matriz tiempo de elución-longitud de onda de excitación de BkF a su longitud de onda máxima de emisión. .... 93
- Figura 16.** Perfiles cromatográficos de los HPAs estudiados en las condiciones experimentalmente evaluadas (A), y en las condiciones usuales con tubos conectores de igual diámetro en todo el equipo (B). .... 94
- Figura 17.** (A) Cromatograma y perfiles espectrales experimentales de los HPAs estudiados en una muestra de validación: FLT (rojo), PIR (azul), BaA (verde), CRI (rosa), BbF (turquesa), BkF (gris), BaP (violeta), DBA (verde claro). (B) Cromatograma y perfiles espectrales recuperados por PARAFAC de cuatro vías para la misma muestra. .... 95
- Figura 18.** (A) Gráficos individuales de concentraciones predichas en función de los valores nominales de cada HPA en muestras de validación y las correspondientes regiones elípticas de confianza conjunta para las pendientes e intersecciones de las regresiones de predicción. (B) Gráfico de concentraciones predichas en función de los valores nominales para todos los HPAs evaluados y la correspondiente elipse global incluyendo

todas las predicciones. Los círculos negros marcan el punto teórico (ordenada al origen = 0, pendiente = 1). .....	98
<b>Figura 19.</b> Estructuras químicas del conjunto de HPAs contaminantes interferentes. ....	101
<b>Figura 20.</b> (A) Cromatogramas y perfiles espectrales experimentales de los potenciales hidrocarburos interferentes (A): AZU (líneas punteadas largas); FE (líneas continuas); IP (líneas y puntos) y BbF (líneas punteadas cortas). (B) Cromatogramas, espectros de emisión y excitación de los potenciales interferentes superpuestos al sistema de HPAs en estudio. ....	102
<b>Figura 21.</b> (A) Gráficos individuales de concentraciones predichas en función de los valores nominales para cada HPA en muestras con potenciales interferentes. (B) Gráfico de concentraciones predichas en función de los valores nominales para todos los HPAs evaluados y la correspondiente elipse global incluyendo todas las predicciones. Los círculos negros marcan el punto teórico (ordenada al origen = 0, pendiente = 1). ....	103
<b>Figura 22.</b> (A) Gráfico de concentraciones predichas por PARAFAC de cuatro vías en función de los valores nominales de los HPAs en muestras de aguas. (B) Gráfico de la región elíptica de confianza conjunta al 95% de confianza. El círculo negro marca el punto teórico (ordenada al origen = 0, pendiente = 1). ....	104
<b>Figura 23.</b> Perfiles espectrales y cromatogramas experimentales de los HPAs en estudio (A) y de potenciales HPAs interferentes (B). ....	109
<b>Figura 24.</b> MEEFs de una muestra de validación con BaA, CRI, BbF y BaP, cada uno a una concentración aproximada de 50 ng mL <sup>-1</sup> medidas a los siguientes tiempos (A) 3,08 min, (B) 4,16 min, (C) 4,34 min, (D) 4,52 min, (E) 4,70 min, (F) 5,06 min, (G) 5,78, (H) 6,14 e (I) 6,50 min. ....	110
<b>Figura 25.</b> Matrices tiempo de elución-longitud de onda de emisión (A) y matrices tiempo de elución-longitud de onda de excitación (B) para BaA, CRI, BbF y BaP a sus correspondientes longitudes de onda máximas de excitación y emisión, respectivamente. ....	111

- Figura 26.** Perfiles espectrales de emisión (A) y perfiles concatenados tiempo/excitación (B) recuperados por MCR-ALS para una muestra que contiene BaA (verde), CRI (rosa), BbF (turquesa) y BaP (violeta). Las líneas grises punteadas en el gráfico B separan, primero la muestra incógnita de las sucesivas muestras de calibración, y el recuadro muestra el modo aumentado de la muestra estudiada. .... 113
- Figura 27.** (A) Gráficos individuales de concentraciones predichas en función de los valores nominales de cada HPA en muestras de validación. (B) Gráfico de concentraciones predichas en función de los valores nominales para todos los HPAs evaluados y región elíptica de confianza conjunta global incluyendo todas las predicciones. El círculo negro marcan el punto teórico (ordenada al origen = 0, pendiente = 1). .... 114
- Figura 28.** (A) Gráficos individuales de concentraciones predichas en función de los valores nominales para cada HPA en muestras con potenciales interferentes. (B) Gráfico de concentraciones predichas en función de los valores nominales para todos los HPAs evaluados y la correspondiente región elíptica conjunta (con 95 % de confianza) para la pendiente y la ordenada de esta regresión. El círculo negro marca el punto teórico (ordenada al origen = 0, pendiente = 1). .... 116
- Figura 29.** Perfiles espectrales, cinéticos y de concentración en las muestras de calibrado para cada HPA: (A) obtenidos experimentalmente, y (B) modelados con PARAFAC para una muestra de validación. BaP (violeta), DBA (amarillo), BbF (naranja), BkF (negro), y BaA (verde) a pH 5 y en presencia de M- $\beta$ -CD..... 125
- Figura 30.** Gráficos de contorno de matrices de excitación-emisión de fluorescencia de muestras de validación (A), de pruebas N° 1 (B) y de pruebas N° 2 (C) durante la degradación de Fenton a los siguientes tiempos de reacción: (1) 0 min, (2) 0,42 min, (3) 1,67 min y (4) 3,75 min. .... 127
- Figura 31.** Gráficos de concentraciones predichas vs nominales ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) de los cinco HPAs obtenidos con PARAFAC de cuatro vías (1) y con PARAFAC de tres vías (2), y regiones elípticas de confianza para la

pendiente y la ordenada al origen de la regresión de PARAFAC de cuatro vías (línea continua) y de tres vías (líneas discontinua) (3) para: (A) las muestras de validación, (B) las muestras del conjunto de prueba N° 1, y (C) las muestras del conjunto de prueba N° 2. Los triángulos rojos en C (1 y 2) muestran las predicciones para BbF. Los círculos negros en las elipses marcan el punto teórico (ordenada al origen = 0, pendiente = 1).....	129
<b>Figura 32.</b> Espectros de excitación y emisión fluorescente normalizados, en presencia de 0,01 mol L <sup>-1</sup> de M-β-CD del sistema de analitos estudiados (A), HPAs seleccionados (B), y agroquímicos seleccionados (C).....	133
<b>Figura 33.</b> Perfiles espectrales y cinéticos predichos por PARAFAC para el conjunto de prueba N° 1. Violeta (BaP), amarillo (DBA), naranja (BbF), negro (BkF) y verde (BaA). Las señales interferentes se muestran en color gris. ....	134
<b>Figura 34.</b> Espectros de excitación y emisión fluorescente normalizados, en presencia de 0,01 mol L <sup>-1</sup> de M-β-CD para el sistema de analitos (A), y las cinco fluoroquinolonas (B) .....	136
<b>Figura 35.</b> Perfiles espectrales y cinéticos predichos por PARAFAC para el conjunto de prueba N° 2. Violeta (BaP), amarillo (DBA), naranja (BbF), negro (BkF) y verde (BaA). Las señales interferentes se muestran en color gris. ....	137
<b>Figura 36.</b> Gráficos de concentraciones predichas por PARAFAC de cuatro vías en función de los valores nominales de los cinco HPAs en muestras de aguas, con y sin preconcentrar (A y B, respectivamente), en presencia de potenciales interferentes, y las correspondientes regiones elípticas de confianza conjunta al 95% de confianza. Los círculos negros marcan el punto teórico ordenada al origen = 0, pendiente = 1.....	139
<b>Figura 37.</b> Evolución de la intensidad fluorescente ( $\lambda_{exc} = 226$ nm; $\lambda_{em} = 305$ nm) y de los gráficos de contorno excitación-emisión de una muestra de validación con BPA y NF durante la degradación de Fenton bajo las condiciones experimentales seleccionadas.....	146



- Figura 38.** Perfiles espectrales y cinético experimentales adquiridos durante la degradación de Fenton del BPA (azul) y NF (naranja) a pH = 3,5 en presencia de M- $\beta$ -CD (A). Perfiles recuperados por PARAFAC de cuatro vías (B) y por MCR-ALS (C) de una muestra de validación..... 147
- Figura 39.** Gráficos de concentraciones predichas en función de los valores nominales de BPA (azul) y NF (naranja) en muestras de validación, procesadas con PARAFAC de cuatro vías (A), U-PLS (B) y MCR-ALS (C) y regiones elípticas de confianza conjunta (al 95% de confianza) para las pendientes y la ordenadas de las regresiones con PARAFAC de cuatro vías (línea de puntos), U-PLS (línea continua) y MCR-ALS (línea de trazos). El punto negro marca el punto teórico (ordenada al origen = 0, pendiente = 1) (D)..... 149
- Figura 40.** Perfiles de BPA (azul), NF (naranja) y constituyentes no calibrados recuperados por PARAFAC de cuatro vías (A), MCR-ALS (B) en una muestra de policarbonato. En el modo aumentado de MCR-ALS las líneas grises punteadas separan primero la muestra estudiada (ampliada en la parte superior) de las sucesivas muestras de calibración. Perfiles recuperados por U-PLS para la misma muestra luego de la convergencia de la trilinealización residual (RTL) para BPA y NF (C). ..... 155

## Abreviaturas

1-ANA	Ácido naftilacético
A	Área
ANT	Antraceno
ASCII	Código norteamericano estándar para el intercambio de información
AZU	Azuleno
BaA	Benzo[ <i>a</i> ]antraceno
BaP	Benzo[ <i>a</i> ]pireno
BbF	Benzo[ <i>b</i> ]fluoranteno
BjF	Benzo[ <i>j</i> ]fluoranteno
BkF	Benzo[ <i>k</i> ]fluoranteno
BPA	Bisfenol A
CBL	Carbaril
CBZ	Carbendazim
CDs	Ciclodextrinas
CG	Cromatografía gaseosa
CIPRO	Ciprofloxacina
CL	Cromatografía líquida
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
CL-MEEF	Datos de tercer orden de origen cromatográfico con matrices de excitación-emisión fluorescente
CRI	Criseno
DAD	Detector de arreglo de diodos
DANO	Danofloxacina
DBA	Dibenzo[ <i>a,h</i> ]antraceno
DCE	Detector de captura electrónica
DEs	Disruptores endócrinos
DFL	Detector de fluorescencia
DVS	Descomposición en valores singulares
ECMP	Raíz cuadrada del error cuadrático medio de la predicción
ECMs	Errores cuadráticos medios
EFS	Extracción en fase sólida
EFSA	Autoridad de control y seguridad alimentaria (siglas en ingles)
EJCR	Región elíptica de confianza conjunta (siglas en inglés)
EM	Espectrometría de masas

ENRO	Enrofloxacin
ERP	Error relativo de la predicci3n
EU	Uni3n Europea
FBZ	Fuberidazol
FE	Fenantreno
FLT	Fluoranteno
FM	Fenarimol
FV	Flujo volum3trico [ $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$ ]
HPAs	Hidrocarburos polic3clicos arom3ticos
HP- $\beta$ -CD	Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
IARC	Agencia Internacional para la Investigaci3n del C3ncer (siglas en ingl3s)
IMZQ	Imazaquin
IP	Indeno[1,2,3- <i>c,d</i> ]pireno
IUPAC	Uni3n Internacional de Qu3mica Pura y Aplicada (siglas en ingl3s)
Kow	Coeiciente de reparto octanol-agua
LDs	L3mites de detecci3n
LOME	Lomefloxacin
LQs	L3mites de cuantificaci3n
MCR-ALS	Resoluci3n multivariada de curvas asistida por cuadrados m3nimos alternantes
MEEFs	Matrices de excitaci3n-emisi3n fluorescente
MNCs	M3ximo nivel de contaminantes
MRL	L3mite m3ximo de residuos
M- $\beta$ -CD	Metil- $\beta$ -ciclodextrina
NAF	1-Naftol
NF	Nonilfenol
NFZ	Norflurazon
NOR	Norfloxacin
PARAFAC	An3lisis paralelo de factores (siglas en ingl3s)
PC	Policarbonato
PCA	An3lisis de componentes principales
PEAD	Polietileno de alta densidad
PET	Polietileno
PIR	Pireno
PP	Polipropileno

PS-E	Poliestireno expandido
PTFE	Politetrafluoroetileno
QAV	Química analítica verde
r	Coeficiente de similaridad
RBL	Bilinealización residual
RTL	Trilinealización residual
TBZ	Tiabendazol
UF	Unidad de intensidad fluorescente
U-PLS	Cuadrados mínimos parciales desdoblados
US-EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta-visible
VLF	Velocidad lineal de flujo [ $\text{m s}^{-1}$ ]



# Introducción

# 1 Introducción

## 1.1 Contaminantes ambientales

Se denomina contaminante ambiental a toda sustancia química con efectos nocivos para la salud, la seguridad y el bienestar de los seres vivos.

La creciente actividad industrial y urbana ha traído consigo el aumento en cantidades apreciables de contaminantes que afectan a la salud humana y a los ecosistemas, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo.

Dentro de la amplia gama de contaminantes químicos se encuentran los agroquímicos, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) y los disruptores endócrinos (DEs). Estas sustancias orgánicas provienen de diversas fuentes: derrames de combustibles, efluentes industriales, desechos líquidos y sólidos de origen animal y humano, productos químicos empleados en el sector agropecuario, etc.

La mayoría de los compuestos mencionados en el párrafo anterior se catalogan como altamente peligrosos, razón por la cual resulta crucial su monitoreo y control mediante determinaciones a nivel de vestigios.

En el caso particular de los pesticidas, su uso intensivo y su inadecuada aplicación hace cada vez más frecuente encontrar altas concentraciones de estos compuestos en cultivos y alimentos, motivo que impulsa a organismos internacionales como la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (US-EPA)<sup>1</sup> y a la Autoridad de Seguridad Alimentaria de la Unión Europea (EFSA, EU)<sup>2</sup> a controlar su presencia en materiales de consumo. La EFSA define el límite máximo de residuos (MRL) de pesticidas como el nivel más alto de restos de pesticidas legalmente tolerado en alimentos.<sup>3</sup> Esta cantidad varía de acuerdo al pesticida y al tipo de muestra.

De manera similar, y para el caso particular de agua potable, la EPA define el

parámetro MNC (máximo nivel de contaminante)<sup>4</sup> como la máxima concentración permitida de un contaminante en el agua que llega a los consumidores.

Específicamente, para los HPAs este límite se establece como inferior a  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>5</sup> Cabe señalar que en aguas superficiales no potables los límites generalmente suelen ser más permisivos tolerándose una concentración para estos contaminantes de hasta  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>6</sup>

Los HPAs se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, por lo que no es raro encontrarlos en alimentos, por ejemplo, en cultivos de té donde se adsorben en la superficie de la hoja desde el aire y de los gases de combustión durante el proceso de secado en la manufactura del té.<sup>7</sup> Considerando que, después del agua, el té es la bebida más consumida en el mundo, la incorporación de los HPAs al organismo mediante esta infusión puede provocar serios problemas de salud.<sup>8</sup> Esto llevó a la EFSA a seleccionar cuatro hidrocarburos como indicadores de la presencia de HPAs en muestras de alimentos.<sup>9</sup>

Finalmente, y en relación a los DEs, la concentración de esta clase de contaminante que puede impactar de manera negativa sobre el sistema endocrino es muy baja, en algunos casos con valores menores a  $1 \text{ ng L}^{-1}$ .<sup>10</sup> Si bien todavía no se estableció una legislación clara acerca de la regulación de DEs, la Dirección General para la Investigación del Parlamento Europeo publicó un informe en el que mostraba su preocupación sobre sus efectos en la salud humana e instaba a que la legislación ambiental tuviera en cuenta el principio de precaución.<sup>11</sup>

Considerando los bajos niveles de los contaminantes mencionados permitidos por las normativas internacionales el desarrollo de nuevos métodos cada vez más

sensibles, selectivos y que no impacten negativamente en el ambiente que se intenta proteger genera un importante desafío para la química analítica actual.

A continuación se presentará una breve reseña de cada tipo de contaminante evaluado en la presente tesis.

### **1.1.1 Agroquímicos**

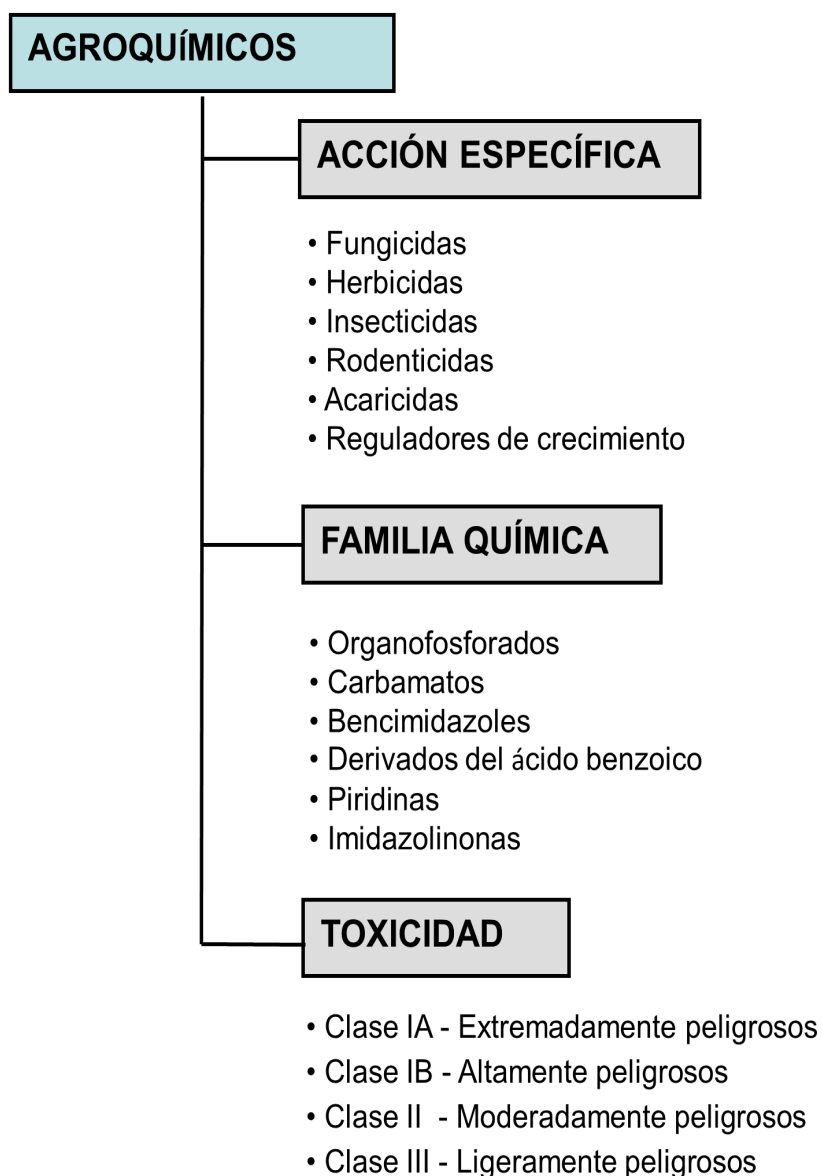
En un sentido amplio, un agroquímico es toda sustancia química utilizada en la agricultura e incluye tanto pesticidas como fertilizantes. Un pesticida, plaguicida, o producto fitosanitario es un compuesto o mezcla de compuestos, naturales o sintéticos, formulados para prevenir, destruir, o mitigar cualquier tipo de plaga. Por otro lado, los fertilizantes son sustancias de origen animal, mineral, vegetal o sintético, utilizados para enriquecer y mejorar características físicas, químicas y biológicas del suelo.<sup>12</sup>

El uso de plaguicidas sintéticos en agricultura tiene su origen a principios del siglo XX, permitiendo, mediante el control masivo sobre organismos dañinos, aumentar significativamente el rendimiento de los cultivos. Es indudable que los avances en los rendimientos de las cosechas estuvieron, y siguen estando, directamente vinculados con la producción de nuevos y eficaces pesticidas.

Debido a la existencia de una gran variedad de compuestos agroquímicos, se han establecido distintos criterios de clasificación. Los criterios más difundidos se relacionan con la acción específica del agroquímico, con su estructura química, y con su toxicidad.

En la Figura 1 se resumen los criterios de clasificación y se incluyen ejemplos en cada grupo.





**Figura 1.** Criterios de clasificación de agroquímicos.

En el primer caso, se hace referencia al tipo de organismo que se controla. Es decir, los herbicidas destruyen malezas y otras plantas no deseadas, los insecticidas eliminan insectos y otros artrópodos, los fungicidas accionan contra hongos, etc.

También es frecuente mencionar al agroquímico de acuerdo a su estructura y a la familia química a la que pertenece (ej: insecticidas organoclorados, organofosforados, herbicidas derivados de la urea, etc.).

Por otra parte, cuando se considera la toxicidad de un agroquímico, se evalúa el

riesgo que ocasiona a la salud humana, ya sea por inhalación, ingestión o penetración cutánea.<sup>13</sup> Las denominaciones utilizadas en la clasificación en base a la toxicidad varían con los organismos que la formulan, siendo la más utilizada la realizada por la Organización Mundial de la Salud.<sup>14</sup>

Los numerosos beneficios del uso de plaguicidas en la actividad agrícola son incuestionables. Sin embargo, se deben destacar diversos aspectos negativos, como la gran resistencia que generan ciertos organismos hacia los plaguicidas, y los efectos nocivos a la salud humana y al ambiente. El contacto con estas sustancias activas se considera altamente peligroso dado que mientras que a corto plazo pueden causar daños menores como dolor de cabeza y náuseas, la exposición en períodos prolongados puede ocasionar problemas reproductivos, alteraciones endócrinas y hasta cáncer.<sup>13</sup>

### ***Agroquímicos investigados***

En este trabajo se cuantificó simultáneamente diez agroquímicos sintéticos ampliamente utilizados en la agricultura de nuestra región. El conjunto de compuestos seleccionados pertenece a diversas familias químicas, con diferentes grados de toxicidad y modos de acción.

En la Tabla 1 se muestran las estructuras de los analitos clasificados por su acción específica.

**Tabla 1:** Agroquímicos investigados.

Estructura	Nombre (abreviatura)	Acción específica
	Tiabendazol (TBZ)	Fungicida
	Fuberidazol (FBZ)	Fungicida
	Carbendazim (CBZ)	Fungicida
	Fenarimol (FM)	Fungicida
	DICAMBA	Herbicida
	Imazaquin (IMZQ)	Herbicida
	Norflorazon (NFZ)	Herbicida
	Carbaril (CBL)	Insecticida
	METIOCARB	Insecticida
	1-Naftol (NAF)	Regulador de crecimiento

### 1.1.2 Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs)

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos cuya estructura base está constituida por carbonos e hidrógenos. Esta gran familia está conformada por moléculas simples, como el metano donde un átomo de carbono se enlaza a cuatro hidrógenos, hasta las que constan de decenas de átomos de carbono enlazados como cadenas lineales o ramificadas, o formando anillos de átomos. Cualquier hidrocarburo que conste de una molécula compuesta por anillos de carbono se denomina hidrocarburo cíclico, si a su vez el hidrocarburo posee un anillo bencénico se lo llama hidrocarburo cíclico aromático.

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) pueden clasificarse según el número de anillos que poseen como HPAs livianos o HPAs pesados, estos últimos con peso molecular mayor a 300 Da.<sup>15</sup> Si tienen como máximo tres anillos fusionados son “livianos” presentan un Kow (coeficiente de reparto octanol-agua) que varía desde 5 a 3, mientras que si en su estructura poseen cuatro o más anillos aromáticos son “pesados” con Kow mayores a 5.

Los HPAs pesados representan un serio problema a la salud humana, ya que numerosos estudios indican que son potenciales agentes cancerígenos,<sup>16,17</sup> razón por la cual su determinación en muestras ambientales y alimenticias es de gran importancia.

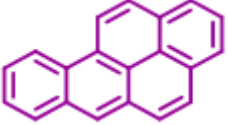
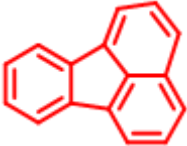
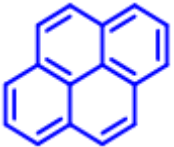
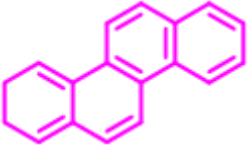
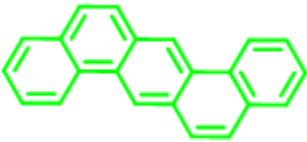
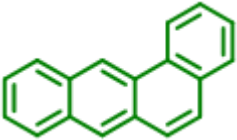
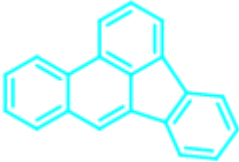
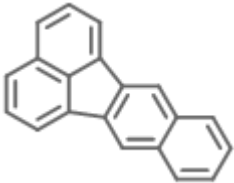
#### ***HPAs seleccionados***

Una característica de ciertos HPAs es la fluorescencia que presentan en solución. Esta propiedad ha sido aprovechada frecuentemente en el desarrollo de métodos de determinación de estos contaminantes en distintas matrices.

En la Tabla 2 se presenta el conjunto de HPAs fluorescentes seleccionados en esta

tesis, sus estructuras y su clasificación de acuerdo a la IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer).

**Tabla 2:** Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs).

Estructura	Nombre (abreviatura)	Clasificación
	Benzo[ <i>a</i> ]pireno (BaP)	1
	Fluoranteno (FLT)	3
	Pireno (PIR)	3
	Criseno (CRI)	2B
	Dibenzo[ <i>a,h</i> ]antraceno (DBA)	2A
	Benzo[ <i>a</i> ]antraceno (BaA)	2B
	Benzo[ <i>b</i> ]fluoranteno (BbF)	2B
	Benzo[ <i>k</i> ]fluoranteno (BkF)	2B

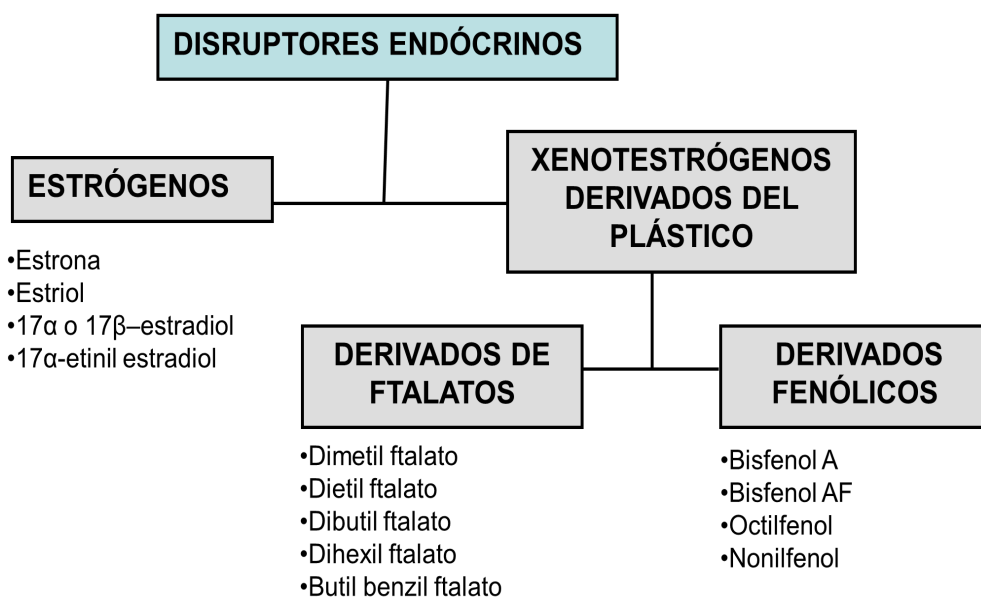
La IARC (IARC, 2015) catalogó a los HPAs que pertenecen: al grupo 1 como carcinógenos, al grupo 2A como probables carcinógenos, 2B posibles carcinógenos y por último los del grupo 3 no clasificable como cancerígenos para los humanos.<sup>17</sup>

### **1.1.3 Disruptores endócrinos (DEs)**

Los disruptores endócrinos (DEs) son moléculas de origen natural o artificial con propiedades hormono-miméticas, que interfieren con la síntesis, almacenaje, transporte, acción o eliminación de hormonas naturales.<sup>18</sup> Estos pueden intervenir en las funciones específicas del sistema endócrino, generando problemas neurológicos y reproductivos en animales y humanos.

Estas moléculas actúan a dosis muy bajas y no inducen efectos tóxicos directos sino perturbaciones pequeñas difíciles de detectar.<sup>19</sup> Debido también a sus potenciales propiedades carcinogénicas y otros efectos adversos a la salud, algunos DEs han sido designados como prioritarios por distintas agencias ambientales a nivel mundial.<sup>20</sup>

Los DEs incluyen estrógenos naturales y sintéticos, y aditivos químicos utilizados en la industria del plástico. En la Figura 2 se muestra la clasificación de DEs con algunos ejemplos relevantes.<sup>10</sup>

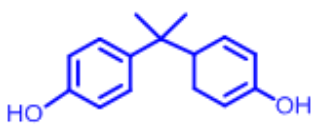



**Figura 2.** Clasificación de disruptores endócrinos.

### *DEs investigados*

Dentro del grupo de DEs xenoestrógenos derivados del plástico, son de particular interés el bisfenol A (BPA) y el nonilfenol (NF), sustancias químicas utilizadas en la fabricación de envases plásticos para alimentos y bebidas, lo que hace inevitable el contacto humano con estos tipos de compuestos.<sup>21,22</sup> Dado sus efectos indeseados como disruptores endócrinos (DEs), es de particular interés su detección y determinación en diversas muestras ambientales y alimenticias.<sup>23,24</sup> En la Tabla 3 se muestra las estructuras de BPA y NP.

**Tabla 3:** Disruptores endócrinos investigados.

Estructura	Nombre (abreviatura)
	Bisfenol A (BPA)
	Nonilfenol (NF)

El BPA se utiliza principalmente en la manufactura de plásticos como monómero

clave en la fabricación de resinas epoxi y policarbonatos (PCs). También cumple la función de antioxidante e inhibidor en la polimerización de algunos plásticos. Tanto el PC como las resinas se encuentran en gran variedad de productos de uso diario como: biberones, botellas de agua, dispositivos médicos y dentales, compositos dentales, recubrimiento de latas de comida y bebidas, etc.

El NP, perteneciente a la familia de los alquilfenoles, se utiliza como precursor químico en la fabricación de surfactantes no iónicos, detergentes hogareños, productos de limpieza y pesticidas. Además, este DE es uno de los principales productos de degradación de los alquilfenoles etoxilados empleados en la industria del plástico.

## **1.2 Determinación de contaminantes orgánicos en muestras ambientales y alimenticias**

Existen numerosos métodos analíticos destinados a la determinación de agroquímicos, HPAs y DEs en diferentes matrices. Entre los métodos tradicionales podemos mencionar: métodos electroquímicos,<sup>25,26</sup> espectroscópicos<sup>27,28</sup> y colorimétricos<sup>29,30</sup>. Sin embargo, la mayoría de las técnicas de rutina incluidas en las normas de protección ambiental se basan en métodos separativos. Los más utilizados son cromatografía gaseosa (CG) acoplada a detectores de captura electrónica (DCE)<sup>31,32</sup> o a espectrometría de masas (EM),<sup>33,34</sup> y cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) con detectores de arreglo de diodos (DAD) y/o fluorescencia (DFL)<sup>35,36</sup>, y más recientemente asociada a detección de masas (EM).<sup>37</sup>

El empleo de CG se ve limitado en el caso de analitos térmicamente inestables y/o con baja volatilidad, dando lugar a la cromatografía líquida como método de elección.<sup>38</sup>



En este último caso, una problemática que se observa a menudo en el análisis cromatográfico es la falta de resolución en los sistemas debido a que estructuras químicas análogas producen interacciones similares de los analitos con cada fase. Frecuentemente, la separación óptima se logra con largos tiempos de análisis y/o con la implementación de gradientes de elución, aunque no siempre estos recursos generan resultados favorables. Otro factor negativo de los métodos cromatográficos, especialmente los de alta complejidad, es que generalmente requieren la aplicación de exhaustivos protocolos de extracción y limpieza de muestras complejas.

### **1.3 Métodos basados en química analítica verde**

Un método analítico verde implica la utilización de una serie de estrategias encaminadas a reducir o eliminar el uso y generación de sustancias peligrosas.<sup>39,40</sup>

Galuszka y col. establecieron doce postulados de la química analítica verde (QAV) como guía para el desarrollo de métodos amigables con el ambiente.<sup>41</sup> Entre las premisas de mayor relevancia podemos encontrar: la aplicación de técnicas directas, evitando el pre-tratamiento de la muestra; el análisis del menor volumen de muestra posible; la disminución de desechos; la disminución del uso de solventes tóxicos; el aumento en la aplicación de técnicas multianalitos, disminución del consumo energético, etc.

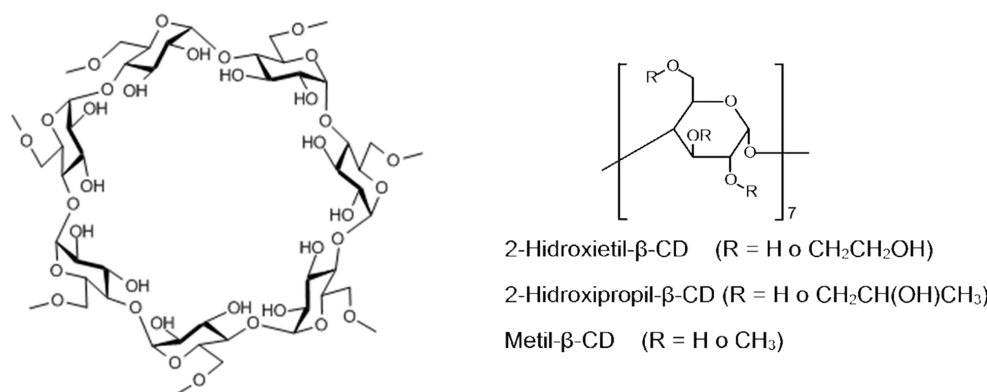
En la actualidad se proponen una gran variedad de estrategias para reducir la contaminación. En esta tesis se desarrollaron métodos basados en calibración multivariada, dentro del marco de los principios de la QAV.

Un recurso aplicado en esta tesis para la determinación de agroquímicos y HPAs se basó en cromatografía líquida en régimen isocrático, realizando una inyección directa de la muestra sin haberla sometido a pre-tratamientos intensivos. Esto se pudo

lograr gracias al acoplamiento del análisis cromatográfico con calibración multivariada de segundo y tercer orden. Como será explicado más adelante, este tipo de calibración puede hacer uso de la "ventaja de segundo orden", propiedad que permite predecir las concentraciones de los analitos en estudio aun en presencia de especies que no se consideraron durante la etapa de calibración.<sup>42,43</sup> Es decir, no es necesario efectuar una limpieza exhaustiva de las muestras investigadas ya que no es preciso separar físicamente los potenciales interferentes contenidos en cada matriz. Por otra parte, no se emplean largos tiempos de análisis debido a que no se requiere resolución en el sistema.

Otra técnica utilizada fue la medida espectrofluorométrica directa, generando los métodos cinético-fluorescentes basados en el uso de calibración de tercer orden. Con el fin de obtener datos de tercer orden/cuatro vías, se utilizó la degradación oxidativa de compuestos orgánicos producida por la reacción de Fenton.

Además de herramientas quimiométricas, en esta tesis se evaluó la aplicación de otras estrategias verdes: se logró aumentar la solubilidad de los contaminantes orgánicos en medio acuoso y las señales fluorescentes mediante el uso de un medio organizado como la ciclodextrina (CD). Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos formados por unidades de glucopiranosas, unidas por enlaces  $\alpha$ -D-(1,4), lo que genera una estructura molecular rígida con una cavidad interior, como lo muestra la Figura 3.



**Figura 3.** Estructura de  $\beta$ -CD y unidad de glucopiranosas con los posibles sustituyentes.

Tanto su estructura como la posición en que se localizan los diferentes grupos hidroxilos le confieren a las CDs variadas propiedades, como por ejemplo cierta polaridad externa (solubilidad en agua) y una cavidad interna apolar, con la posibilidad de formar complejos mediante la inclusión de moléculas hidrofóbicas. Existen distintas CDs, clasificadas por las unidades de glucosa que la conforman. Las CDs nativas más frecuentemente utilizadas con propósitos analíticos son  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD, que poseen seis, siete y ocho unidades de glucopiranosas, respectivamente. A su vez, las CDs pueden estar sustituidas con diferentes grupos alquilo o hidroxialquilo generando derivados con mayor solubilidad (Figura 3).<sup>44</sup> El uso de estos compuestos no tóxicos permite obtener señales fluorescentes de alta intensidad en medio acuoso, evitando así el uso de solventes orgánicos contaminantes, en concordancia con los principios de la QAV.

## 1.4 Análisis quimiométrico de los datos

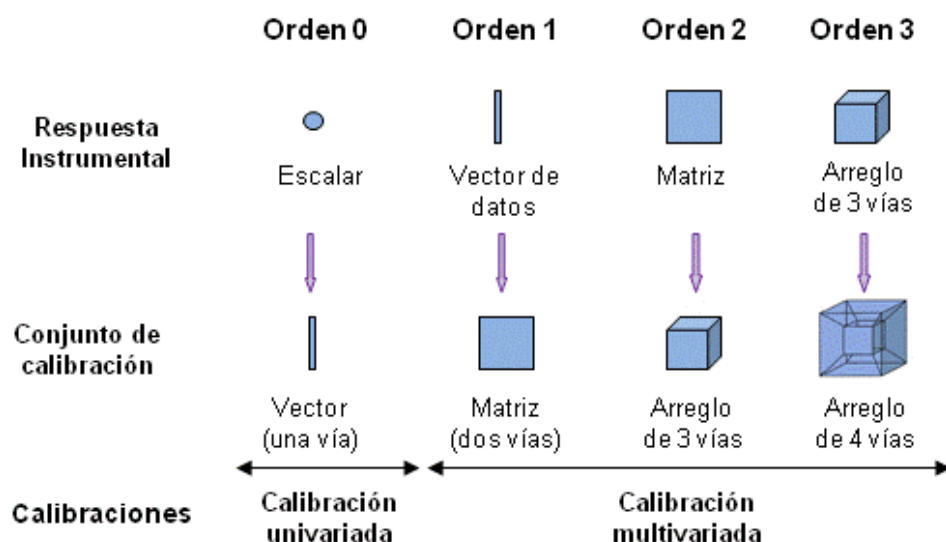
Un análisis cuantitativo puede realizarse mediante diferentes técnicas de calibrado. El tipo de calibración se define en función de la dimensión de los datos, pudiendo ser univariada o multivariada.

En una calibración univariada se obtiene un solo valor numérico por medida, o sea una sola respuesta instrumental por muestra (ejemplo: un valor de absorbancia).

Una calibración multivariada puede incluir vectores, matrices o datos de orden superior. Si la respuesta instrumental está conformada por un conjunto de valores numéricos se genera un vector (ejemplo: cromatograma) y si el dato combina dos modos diferentes se forma una matriz (ejemplo: medida de intensidad de emisión fluorescente a diferentes longitudes de onda de excitación). Para orden superior, los datos poseen tres o más dimensiones por muestra.

Por otro lado, con los datos de un grupo de muestras es posible crear un arreglo teniendo un modo adicional: el modo muestral. Por ejemplo, las medidas univariadas pueden agruparse para formar un vector, los datos de primer orden pueden ubicarse en forma adyacente y crear una matriz, etc. En base a esto, se desarrolló una nomenclatura alternativa nombrando a las calibraciones de acuerdo al número de vías (modos) de un arreglo para un juego de muestras. Así, la calibración de orden cero es también calibración de una vía, la de primer orden es de dos vías, la de segundo orden es de tres vías, etc. Es habitual nombrar a todas las metodologías de calibración que involucran datos de segundo orden y de orden superior como calibración de múltiples vías, que es por lo tanto, una subdivisión de la calibración multivariada.

La Figura 4 proporciona un resumen compacto de la jerarquía de datos y calibraciones.



**Figura 4.** Representación del orden de los datos y sus calibraciones asociadas.

Se pueden destacar varios beneficios que posee la calibración multivariada: uno de ellos es la posibilidad de la cuantificación simultánea de varios analitos en una misma muestra, y otro es el uso de la “ventaja de segundo orden”.<sup>43</sup> Esta propiedad permite cuantificar analitos en presencia de potenciales interferentes, no modelados en el proceso de calibración.

En particular, el empleo de calibración multivariada de tercer orden o cuatro vías con fines analíticos se ha incrementado significativamente en los últimos años.<sup>45</sup> Esto se debe a que, además de poseer la ventaja de segundo orden, la calibración de tercer orden permite también desarrollar métodos más sensibles y selectivos.<sup>46</sup> La mayor sensibilidad está dada por la medida redundante del dato que genera un menor impacto negativo del ruido en la señal, mientras que el aumento de la selectividad se debe al aporte de un nuevo modo instrumental que contribuye de manera positiva a la selectividad total.<sup>47</sup> Se destaca la capacidad de este tipo de calibración para predecir resultados correctos aún en presencia de colinealidad que no puede resolverse con calibración de segundo orden. Esta propiedad se denomina “ventaja de tercer

orden”.<sup>48,49</sup>

Se han desarrollado diferentes algoritmos matemáticos con el fin de procesar datos de segundo y tercer orden. Entre los más difundidos dentro de la comunidad analítica destacamos a PARAFAC (análisis paralelos de factores), U-PLS (regresión en cuadrados mínimos parciales desdoblados) y MCR-ALS (resolución multivariada de curvas asistida por cuadrados mínimos alternantes).<sup>46</sup>

Seguidamente, se efectuará una descripción sucinta de los modelos quimiométricos aplicados en la presente tesis, en el orden en que fueron utilizados en las distintas etapas de trabajo.

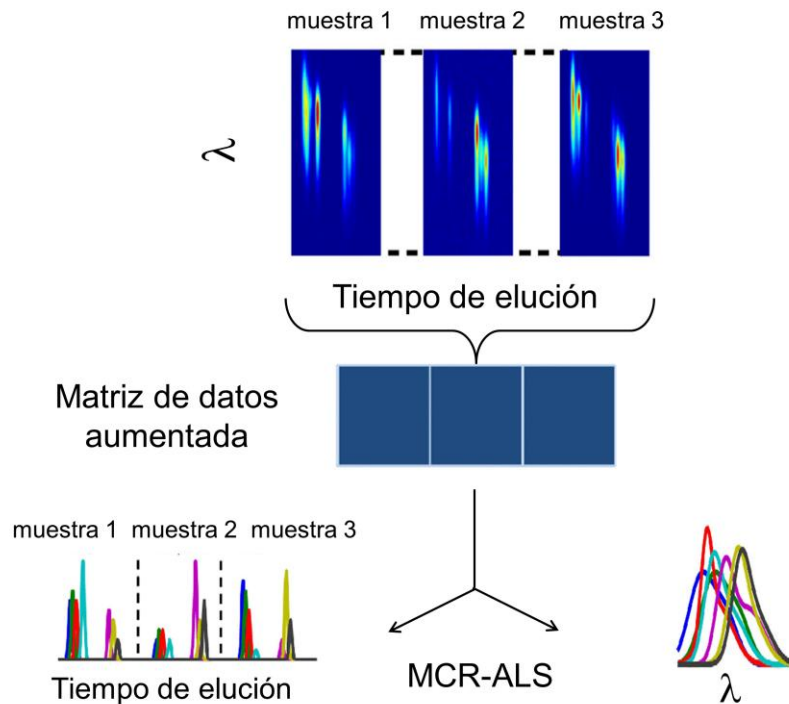
### **1.4.1 Datos cromatográficos de segundo orden**

En general, los datos cromatográficos de segundo orden están constituidos por longitudes de onda de absorbancia o emisión fluorescente y tiempos de elución.

Una dificultad que presenta el procesamiento de datos cromatográficos es la falta de reproducibilidad en las formas de las bandas o en la dimensión temporal. Esto nos lleva a elegir para el análisis quimiométrico de la primera parte de esta tesis al algoritmo MCR-ALS, que tiene en cuenta la pérdida de trilinealidad cuando la matriz aumentada es bilineal.

La Figura 5 ilustra la aplicación de MCR-ALS a partir de matrices espectrales y cromatográficas individuales, que permiten la construcción de una matriz aumentada a lo largo de la dirección del tiempo de elución. La descomposición de esta última matriz en términos de componentes bilineales lleva a la recuperación de los perfiles de los componentes puros individuales en dirección aumentada de tiempo en el modo espectral.

A continuación se efectuara una breve reseña del modelo MCR-ALS.



**Figura 5.** Representación esquemática de la aplicación de MCR-ALS a datos cromatográfico-espectrales de segundo orden.

### ***MCR-ALS: datos de segundo orden/tres vías***

El algoritmo MCR-ALS asume un modelo bilineal en donde las respuestas individuales de cada componente es aditiva, y la matriz aumentada se genera a lo largo del modo que rompe la trilinealidad:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C} \times \mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

Las columnas de  $\mathbf{D}$  contienen los cromatogramas medidos a  $J$  tiempos para  $(I_{cal} + 1)$  muestras diferentes a  $K$  longitudes de ondas; las columnas de  $\mathbf{C}$  contienen los tiempos de elución aumentados de las especies intervinientes; las columnas de  $\mathbf{S}$  de los espectros relacionados, y  $\mathbf{E}$  es la matriz de residuos no ajustados por el modelo. Los tamaños de estas matrices son:  $\mathbf{D}$ ,  $J(I_{cal}+1) \times K$ ,  $\mathbf{C}$ ,  $J(I_{cal}+1) \times N$ ,  $\mathbf{S}$ ,  $K \times N$ ,  $\mathbf{E}$ ,  $J(I_{cal}+1) \times K$  ( $N$  es el número de componentes). Como se puede observar,  $\mathbf{D}$  contiene datos para las muestras de calibración  $I_{cal}$  y para la muestra incógnita. La

descomposición de **D** se realiza por medio de cuadrados mínimos alternantes de los elementos contenidos en **E**, bajo las condiciones restrictivas adecuadas tales como la no-negatividad, la unimodalidad, correspondencia, selectividad, trilinealidad.

El algoritmo MCR-ALS requiere una inicialización con parámetros tan cercanos como sea posible a los resultados finales. Por ejemplo, los espectros de las especies se pueden obtener a partir de soluciones estándares de cada analito puro o del análisis del llamado espectro “puro”, un algoritmo multivariado que extrae el espectro del componente puro a partir de una serie de espectros de las mezclas de composición variada. El algoritmo realiza un procedimiento ALS iterativo para la estimación de los perfiles espectrales o de concentración de cada analito interviniente. Para lograr esta estimación se utilizan diferentes métodos como la evolución de análisis factorial o la determinación de variables de mayor pureza.

Luego de la descomposición de **D** con MCR-ALS, la información de la concentración contenida en los perfiles de elución (matriz **C**) puede utilizarse para realizar las predicciones cuantitativas, definiendo el *score* del analito como el área bajo el perfil de cada muestra, según la Ecuación (2).

$$a(i,n)=\sum_{j=1}^{ij} C(j,n) \quad (2)$$

Donde  $a(i,n)$  es el *score* del analito  $n$  en la muestra  $i$ , y  $C(j,n)$  es el elemento del perfil del analito en el modo aumentado. Los *scores* del analito en las muestras de calibración se emplean para construir un gráfico de calibración pseudo-univariada en función de las concentraciones nominales del analito, prediciendo la concentración en la muestra por interpolación del *score* de la muestra.



### 1.4.2 Datos cromatográficos de tercer orden

Aunque los datos de tercer orden se pueden generar de diferentes formas, los procedimientos comúnmente aplicados para obtenerlos incluyen cromatografía bidimensional de gases y de líquidos (CG-CG y CL-CL) con detección espectral, y matrices de excitación-emisión de fluorescencia (MEEFs) acopladas a una cinética de reacción o como sistema de detección en una cromatografía unidimensional.<sup>50</sup> En este último caso, la estrategia consiste en registrar las MEEFs en función del tiempo de elución. El principal problema es encontrar las condiciones experimentales e instrumentales que permitan obtener un adecuado número de MEEFs conteniendo información satisfactoria en un corto tiempo.

En un artículo recientemente publicado por Montemurro y col.<sup>51</sup> se efectuó una revisión de los distintos procedimientos utilizados para la obtención de datos de tercer orden CL-MEEF, y se expusieron las siguientes estrategias:

(1) Recolectar eluatos de diferentes fracciones a lo largo de todo el experimento cromatográfico y luego medir las MEEFs de cada fracción.

(2) Realizar el mismo experimento cromatográfico varias veces registrando la matriz tiempo de elución-espectros de emisión cada vez a diferentes longitud de onda de excitación.

(3) Obtener datos de tercer orden CL-MEEF en línea, realizando medidas cromatográficas a múltiples longitudes de onda de excitación y emisión en tiempo real.

Cabe señalar que la correcta elección del algoritmo para el modelado de estos datos es crítica y depende de la propiedad de multilinealidad generada en cada estrategia.<sup>50,51</sup> De acuerdo a sus características de multilinealidad, los datos de tercer

orden pueden clasificarse en las siguientes categorías:

a\_ Datos cuadrilineales (cada arreglo tridimensional de datos es trilineal y no hay ningún modo que rompa con la cuadrilinealidad).

b\_ Datos no-cuadrilineales tipo 1, 2 ó 3 (donde 1, 2 ó 3 son los modos respectivos que pierden la cuadrilinealidad).

c\_ Datos no-cuadrilineales tipo 4 (donde hay correlación entre dos o más modos).<sup>51,52</sup>

En los datos obtenidos con la estrategia (1), la pérdida de cuadrilinealidad se debe a la falta de reproducibilidad en los tiempos de elución entre los experimentos cromatográficos sucesivos y las pequeñas diferencias en los tiempos de recolección de las fracciones de eluato, clasificándose como datos no-cuadrilineales tipo 1. Para este caso se sugiere modelar con los siguientes algoritmos: APARAFAC (análisis paralelo de factores aumentado), MCR-ALS o U-PLS/RTL (regresión de cuadrados mínimos parciales desdoblados con trilinealización residual). Estos algoritmos permiten analizar datos no-cuadrilineales ya que se aplican a arreglos de datos aumentados tridimensionales (trilineales), a matrices bilineales y a vectores desdoblados, respectivamente.<sup>53,54</sup>

Cuando se utiliza la estrategia (2), los datos son cuadrilineales solo si los tiempos de elución y la forma de las bandas son perfectamente reproducibles para un conjunto de muestras. Este comportamiento ideal no se observa en sistemas reales. No obstante, estos datos se pueden modelar exitosamente con U-PLS/RTL y MCR-ALS debido a la flexibilidad en la estructura interna de estos modelos y también por el bajo grado de no-cuadrilinealidad de los datos.<sup>52,55</sup>

Finalmente, la estrategia (3) presenta serias dificultades cuando se intenta obtener

datos CL-MEEF en línea y mantener las condiciones de cuadrilinealidad para un conjunto de muestras. El problema surge debido a que el tiempo requerido para medir cada MEEF de manera completa y con la cantidad suficiente de sensores de excitación y emisión es demasiado largo, generándose variaciones significativas en la concentración local del analito dependiente de la longitud de onda de excitación. La dependencia mutua entre los perfiles de excitación y los perfiles temporales dan como resultado datos no cuadrilíneos tipo 4.<sup>54</sup>

### ***Datos CL-MEEF cuadrilineales***

En la presente tesis se propuso una estrategia experimental para la obtención de datos de tercer orden cuadrilineales CL-MEEF en línea. Este procedimiento sencillo consiste en disminuir la velocidad de flujo lineal aumentando el diámetro del tubo conector entre la columna y el detector. Esta modificación permite la adquisición de MEEFs que conforman un arreglo de cuatro vías cumpliendo con la condición de cuadrilinealidad y pudiendo resolverse correctamente con PARAFAC de cuatro vías.

### ***PARAFAC de cuatro vías***

Los datos de cuatro vías se generan uniendo los arreglos de tercer orden, para muestras de calibración y cada una de las muestras de validación o de las muestras de pruebas analizadas. La aplicación del modelo PARAFAC a estos arreglos de cuatro vías requiere el ajuste de la siguiente expresión:

$$F_{ijkl} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} d_{ln} + \mathbf{E}_{ijkl} \quad (3)$$

donde  $F_{ijkl}$  es un elemento del arreglo de cuatro vías formado por las señales MEEF-tiempo de elución,  $N$  es el número de componentes totales que dan respuestas,  $a_{in}$  es la concentración relativa de los componentes  $n$  en la muestra  $i$ ;  $b_{jn}$ ,  $c_{kn}$ , y  $d_{ln}$  son

las intensidades normalizadas del canal de tiempo  $j$ , y de la longitud de onda de emisión  $k$  y de excitación  $l$ , respectivamente y  $E_{ijkl}$  es un elemento de la matriz de errores no ajustado por el modelo. Los *scores* (concentraciones relativas) se colectan en la matriz **A**, de tamaño  $(I_{\text{cal}} + 1) \times N$ , donde  $I_{\text{cal}}$  es el número de muestras de calibración. Los *loadings* (intensidades normalizadas) se colectan en las matrices de perfiles **B**, **C** y **D**, de tamaño  $J \times N$ ,  $K \times N$  y  $L \times N$ , respectivamente, donde  $J$ ,  $K$  y  $L$  son el número de canales de tiempo, emisión y excitación, respectivamente.

La estructura del modelo de la Ecuación (3) se llama cuatrilínea, y su única descomposición se realiza habitualmente mediante mínimos cuadrados alternantes.<sup>56,57</sup> Esto constituye la base de lo que denominamos “ventaja de segundo orden”, que permite analizar los valores de concentración de analitos, aun en presencia de interferentes no modelados en la calibración.

Se debe tener en cuenta varios aspectos cuando se aplica el modelo PARAFAC en una calibración de cuatro vías: (1) inicialización del algoritmo, (2) aplicación de restricciones en el ajuste por cuadrados mínimos, (3) determinación del número componentes que den respuesta, (4) identificación de los componentes específicos a partir de la información otorgada por el modelo, (5) calibración del modelo para obtener las concentraciones absolutas de cada componente en una muestra desconocida.

La inicialización por PARAFAC de cuatro vías para el ajuste de datos de cuatro vías puede realizarse utilizando varias opciones:<sup>56</sup> (1) descomposición por valores singulares (DVS), (2) valores ortogonalizados aleatorios, (3) el mejor ajuste del modelo utilizando pocas iteraciones.

Se puede aplicar la restricción de no-negatividad a los *loading* y *scores* durante la etapa de ajuste por cuadrados mínimos alternantes y la convergencia se consigue cuando se observa un cambio relativo en el ajuste a  $1 \times 10^{-6}$ . El número de componentes ( $N$ ) se calcula mediante el análisis de los residuos,<sup>58</sup> considerando la suma de errores cuadráticos (SSE), es decir la suma de los cuadrados de los elementos del arreglo **E** en la Ecuación (3).

$$SSE = \sum_{i=1}^{I_{cal}+1} \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^L (\mathbf{E}_{ijkl})^2 \quad (4)$$

Este parámetro decrece cuando aumenta  $N$ , hasta estabilizarse en un valor correspondiente al número óptimo de componentes. Además, se evalúan los perfiles espectrales producidos por la adición de componentes sucesivos: si el nuevo componente produce un perfil repetido, esto sugiere un sobreajuste y por lo tanto se selecciona el número de componente previo al agregado.

La identificación de los constituyentes químicos bajo investigación se realiza por comparación de los perfiles **B**, **C** y **D** obtenidos con los de los analitos puros.

Las concentraciones absolutas de los analitos se obtienen después de la calibración, ya que la descomposición de cuatro vías proporciona solo valores relativos (*scores* contenidos en la matriz **A**). La calibración se realiza utilizando un conjunto de soluciones con concentraciones conocidas de los analitos, procedimiento que se repite con cada muestra nueva analizada.

En resumen, los pasos a seguir en una calibración de tercer orden/cuatro vías utilizando el algoritmo PARAFAC son:

1) Construir un arreglo de tamaño  $(I_{cal} + 1) \times J \times K \times L$  con los primeros  $I$  arreglos de tercer orden MEEF-tiempo, para las muestras de entrenamiento de

concentraciones conocidas y las muestras a investigar.

- 2) Descomponer el arreglo y obtener los perfiles en **A**, **B**, **C**, y **D**.
- 3) Identificar los  $n$  analitos de interés con los perfiles **B**, **C**, y **D**.
- 4) Efectuar una regresión de los primeros  $I_{cal}$  elementos de la columna  $a_n$  en función de las concentraciones conocidas  $c_{cal}$  del analito  $n$ :  $[a_{1,n} \dots a_{I_{cal},n}] = k_1 \times c_{cal}$  (calibración pseudo-univariada).
- 5) Convertir las concentraciones relativas del analito  $n$  en concentraciones absolutas en la muestra desconocida, a partir del último elemento de la columna  $a_n$ :  $c_{unk} = a_{I_{cal}+1,n}/k_1$ .

### ***Datos CL-MEEF no-cuadrilineales tipo 1***

Los datos de origen cromatográfico con detección de MEEF, donde se produce la ruptura de la cuadrilinealidad en el modo tiempo de elución, se clasifican como no cuadrilineales de tipo 1. En el análisis de este tipo de datos con el modelo MCR-ALS se debe conformar una matriz supraumentada de la siguiente manera: los modos espectrales de excitación y emisión de cada MEEF se desdoblan en un solo modo combinado, generando un vector fila de dimensión  $(1 \times LK)$ . Luego, se constituye una matriz de tamaño  $(J \times LK)$  para cada muestra, colocando las filas MEEFs desdoblada para cada tiempo de elución, una debajo de la otra. Finalmente, se construye una matriz de datos supraumentada **D**, de tamaño  $[J (I_{cal} + I) \times LK]$ , donde  $I_{cal}$  es el número de muestras de calibración, y se aplica el análisis MCR-ALS de manera análoga a los datos de segundo orden.

La descomposición produce una matriz de perfiles de concentración aumentados, conteniendo los perfiles de elución de las diferentes muestras (**C**), una matriz de perfiles MEEF desdobladas (**S**<sup>T</sup>) de los  $N$  componentes, y una matriz residual (**E**)

conteniendo los errores del modelo, de acuerdo a la Ecuación (1), ver página 34. La matriz  $\mathbf{C}$  posee los perfiles de tiempo de elución para todos los sub-perfiles  $[J(I_{\text{cal}}+1)]$  de los  $N$  componentes resueltos. La matriz MEEF desdoblada  $\mathbf{S}^T$  de tamaño  $N \times LK$  puede reconstruirse en  $N$  matrices de excitación-emisión de tamaño  $L \times K$ , una para cada componente, que puede usarse para la identificación de los componentes. Por otro lado, las áreas bajo los perfiles de tiempo de elución de cada muestra en la matriz de datos superaugmentada se utilizan para fines cuantitativos.

### ***Datos CL-MEEF no-cuadrilineales tipo 4***

Continuando con la generación de datos cromatográficos de tercer orden en línea, en un siguiente trabajo, en vez de modificar el diámetro de la tubería del equipo para adquirir correctamente las MEEFs en línea, se decidió emplear el instrumental convencional (CLAE-espectrofluorómetro de barrido rápido) y resolver a nivel quimiométrico la mutua dependencia entre los perfiles de excitación y tiempo. Esto se logró aplicando una estrategia en el procesamiento de los datos con el modelo MCR-ALS, hasta ahora nunca utilizada con datos no-cuadrilineales de tipo 4.

Dentro de los datos no-cuadrilineales de tipo 4 se incluyen subtipos, que se clasifican de acuerdo al número de modos instrumentales mutuamente dependientes. En el caso donde solo dos modos son mutuamente dependientes, dichos modos se pueden concatenar generando un arreglo de tres vías, y el procesamiento de los datos estará sujeto a la existencia de otros fenómenos adicionales de dependencia.

En el caso de datos CL-MEEF tipo 4, los dos modos mutuamente dependientes son el tiempo de elución y las longitudes de onda de excitación. Dado que el modo tiempo de elución depende de la muestra, esta dependencia se trasladará al modo tiempo de elución-excitación concatenado. Por lo tanto, el arreglo de tres vías

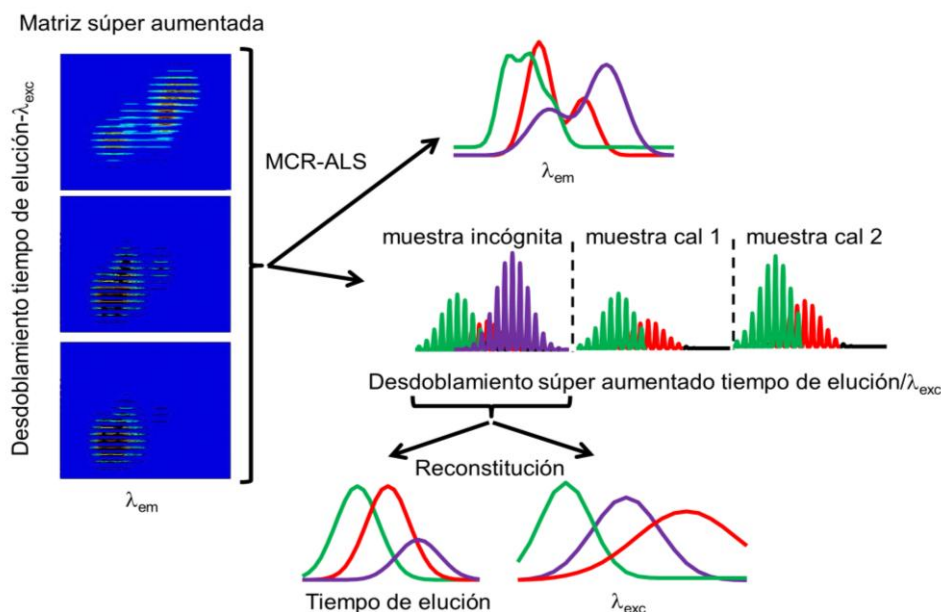
resultante se clasifica como no-trilineal tipo 1, y puede procesarse de manera adecuada con MCR-ALS mediante una matriz superaugmentada en la cual el modo aumentado es el modo tiempo de elución-excitación. El restante modo instrumental, modo espectral de emisión, es independiente de los otros modos y común para todos los datos.

Como en los sistemas de segundo orden, se deben aplicar restricciones durante la descomposición de MCR-ALS para lograr un ajuste por cuadrados mínimos que conduzcan a soluciones con significado químico.

Luego de la descomposición de la matriz superaugmentada de datos, la etapa de calibración es análoga a lo descrito anteriormente: se construye una recta de calibrado pseudo-univariada con los *scores* de los analitos de la muestra de calibración, y se interpola el *score* del analito en la muestra incógnita para la predicción de su concentración.

Con el fin de ilustrar la estructura de los datos y el procesamiento realizado con el algoritmo, en la Figura 6 se muestra una representación gráfica de la matriz superaugmentada para un sistema hipotético formado por dos analitos en presencia de un interferente y su tratamiento con MCR-ALS.





**Figura 6.** Esquema ilustrativo del procesamiento por MCR-ALS de datos no-cuadrilineales tipo 4. Izq.: se construye la matriz súper aumentada de las muestras utilizando como modo común al modo emisión y se coloca de manera desplegada el modo tiempo de elución-excitación a lo largo de la dirección aumentada. Der.: MCR-ALS descompone a la matriz súper aumentada en espectros de emisión y en perfiles desplegados tiempo de elución-excitación para los componentes en todas las muestras (en el ejemplo la muestra la solución incógnita y dos muestras de calibración). Para cada muestra, los perfiles de los componentes en el modo aumentado, se desdoblan en perfiles separados de tiempo de elución y excitación, pudiendo identificar así a cada componente.

### 1.4.3 Datos cinético-espectroscópicos de tercer orden (C-MEEFs)

#### *PARAFAC de cuatro vías*

El procesamiento de datos de origen cinético-espectroscópico con PARAFAC de cuatro vías se realiza de igual modo que para los datos cromatográficos de tercer orden. Se sigue la expresión de la ecuación (3), ver página 38, donde  $F_{ijkl}$  es un elemento del arreglo de cuatro vías formado para este caso por la señales MEEF-tiempo de degradación,  $N$  es el número de componentes totales que dan respuestas,  $a_{in}$  es la concentración relativa de los componentes  $n$  en la muestra  $i$ ;  $b_{jn}$ ,  $c_{kn}$ , y  $d_{ln}$  son las intensidades normalizadas a la longitud de onda de excitación  $j$ , longitud de onda de emisión  $k$ , y el canal de tiempo  $l$  y  $E_{ijkl}$  es un elemento de la matriz de errores no ajustado por el modelo.

### ***MCR-ALS: datos de tercer orden/cuatro vías***

En el procesamiento de los datos con este modelo se generó la antes mencionada matriz superamentada originada con el desdoblamiento de los modos de excitación y tiempo de degradación para cada muestra, colocando las matrices de datos a lo largo del modo emisión.

La matriz de datos supraumentada **D** posee un tamaño  $[J(I_{\text{cal}}+1) \times KL]$ , donde  $I_{\text{cal}}$  es el número de muestras de calibración.<sup>59</sup>

Después de constituir la matriz supraumentada **D**, la descomposición de los datos por MCR-ALS con el modelo bilineal es análoga a la realizada para datos de segundo orden (ver página 34).

### ***U-PLS/RTL***

U-PLS es una versión del algoritmo de primer orden PLS y su función es modelar datos de orden superior. En el modelo U-PLS, los datos de tercer orden se desdoblán en vectores antes de aplicar el algoritmo de cuadrados mínimos parciales PLS.<sup>60,61</sup>

Este procedimiento permite generar un conjunto de *loadings* **P** y *weight-loadings* **W** (de tamaño  $JKL \times A$ , donde  $A$  es el número de variables latentes), así como los coeficientes de regresión **v** (de tamaño  $A \times 1$ ). El parámetro  $A$  habitualmente se selecciona por medio de la técnicas de validación cruzada.<sup>62</sup>

Si la muestra incógnita no posee compuestos inesperados, **v** puede emplearse para estimar la concentración del analito de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\mathbf{y}_u = \mathbf{t}_u^T \mathbf{v} \quad (5)$$

donde  $\mathbf{t}_u$  (de tamaño  $A \times 1$ ) es el *score* de la muestra incógnita, obtenido al proyectar los datos vectorizados provenientes de última  $[\text{vec}(\mathbf{X}_u)]$  de tamaño

$(JKL \times 1)$  en el espacio de los  $A$  factores latentes:

$$\mathbf{t}_u = (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\mathbf{X}_u) \quad (6)$$

donde  $\text{vec}(\cdot)$  es el operador de vectorización.

Cuando se encuentran presentes constituyentes inesperados en la muestra incógnita ( $\mathbf{X}_u$ ), los *scores* dados por la Ecuación (6), podrían generar residuos anormalmente mayores comparados con el ruido instrumental usual.

Esta situación se puede solucionar mediante un procedimiento denominado trilinearización residual (RTL), basado en el modelo Tucker3 de los efectos producidos por los componentes inesperados.<sup>60</sup>

La RTL tiene como objetivo minimizar los residuos calculados al ajustar los datos de la muestra a la suma de las diferentes contribuciones, según las siguientes ecuaciones:

$$\text{vec}(\mathbf{X}_u) = \mathbf{P} \mathbf{t}_u + \text{vec}[\text{Tucker3}(\mathbf{E}_p)] + \mathbf{e}_u \quad (7)$$

$$\mathbf{E}_p = \text{reshape}(\mathbf{e}_p) \quad (8)$$

donde  $\text{reshape}(\cdot)$  indica la transformación de vector de tamaño  $JKL \times 1$  en un arreglo de tres vías de tamaño  $J \times K \times L$ , y  $\mathbf{e}_p$  es el residuo del modelado de la señal de la muestra con las variables latentes de PLS. Durante el procedimiento de RTL, los *loadings*  $\mathbf{P}$  se mantienen constantes a los valores de calibración, y  $\mathbf{t}_u$  varía hasta que el error residual final de RTL  $s_u$  se minimiza utilizando un procedimiento de Gauss-Newton.

El número de interferentes  $N_i$  puede estimarse calculando el residuo final  $s_u$  en función de  $N_i$ . La estabilización del valor  $s_u$ , compatible con el ruido experimental, permite estimar el número correcto de componentes.



# Objetivos

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivos generales

– Desarrollar nuevos métodos de análisis para la determinación de contaminantes de interés ambiental, utilizando estrategias compatibles con los principios de la química analítica verde.

### 2.2 Objetivos específicos

– Desarrollar un método de cuantificación de agroquímicos de uso frecuente, acoplando calibración multivariada a cromatografía líquida de alta eficiencia en modo isocrático con detección de arreglo de diodos y detección fluorescente.

– Desarrollar métodos verdes de cuantificación de hidrocarburos policíclicos aromáticos utilizando calibración de tercer orden/cuatro vías a partir de datos generados con las siguientes estrategias: 1) datos de origen cromatográfico-espectroscópico de tercer orden cuadrilineales generados en línea, 2) datos de origen cromatográfico-espectroscópico de tercer orden no-cuadrilineales de tipo 4 medidos con equipamiento convencional conformado por un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrofluorómetro de barrido rápido, 3) datos de tercer orden generados a partir de la evolución cinética de matrices de excitación-emisión de fluorescencia con el reactivo de Fenton.

– Desarrollar un método de determinación simultánea de dos disruptores endócrinos ampliamente utilizados en la industria del plástico, bisfenol A y nonilfenol, basado en datos tercer orden generados a partir de la medida de sus matrices de excitación-emisión de fluorescencia al someter al sistema a la degradación de Fenton.

- Evaluar y discutir los modelos quimiométricos seleccionados para el correcto tratamiento de los datos en cada sistema estudiado.
- Validar los métodos desarrollados en base a recuperaciones y cifras de mérito e indicadores estadísticos en muestras sintéticas, y frente a técnicas de referencia en muestras reales.
- Aplicar los métodos desarrollados a muestras que puedan contener los analitos evaluados: agroquímicos en vegetales cultivados en tierra, hidrocarburos policíclicos aromáticos en aguas naturales y distintas variedades de hojas de té, y xenoestrógenos en recipientes plásticos que tomen contacto con alimentos y bebidas.



## Sección experimental

## 3 Sección experimental

### 3.1 Reactivos

Todos reactivos empleados fueron comerciales y de grado analítico:

- ♦ Carbaril (CBL), 1-naftol (NAF), tiabendazol (TBZ), ácido naftilacético (1-ANA), benzo[*a*]antraceno (BaA), benzo[*a*]pireno (BaP), benzo[*b*]fluoranteno (BbF), benzo[*k*]fluoranteno (BkF), criseno (CRI), dibenzo[*a,h*]antraceno (DBA), fluoranteno (FLT), pireno (PIR), fenantreno (FE), antraceno (ANT), azuleno (AZU), indeno[1,2,3-*c,d*]pireno (IP), benzo[*j*]fluoranteno (BjF), lomefloxacin (LOME), norfloxacin (NOR), y metil- $\beta$ -ciclodextrina (M- $\beta$ -CD) y bifenol A (BPA) se compraron en Sigma Aldrich (Milwaukee, EE.UU.).
- ♦ Carbendazim (CBZ), DICAMBA, fenarimol (FM), imazaquin (IMZQ), METIOCARB, norflurazon (NFZ), ciprofloxacina (CIPRO), enrofloxacin (ENRO) y nonilfenol (NF) se obtuvieron de Fluka (Buchs, Suiza).
- ♦ Fuberidazol (FBZ) y danofloxacin (DANO) se obtuvieron de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania), y  $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e hidroxipropil- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD) en Cyclolab (Budapest, Hungría).
- ♦ Acetonitrilo, metanol, fosfato ácido de sodio, ácido fosfórico, ácido acético, acetato de sodio, y sulfato amónico ferroso se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania), y acetato de etilo y peróxido de hidrógeno 30% (p/p) se compraron en Cicarelli (Bs. As., Argentina).
- ♦ El agua ultrapurificada se obtuvo mediante un sistema Millipore (Massachusetts, EE.UU.).



## 3.2 Soluciones patrón

Las soluciones patrón se prepararon pesando las drogas sólidas con balanza analítica y luego llevando a volumen final con el solvente adecuado.

En el caso particular de los agroquímicos se llevó a volumen final de 5,00 mL con metanol. Las concentraciones variaron entre 400 y 1000 mg L<sup>-1</sup>.

Las soluciones patrón de HPAs se prepararon de 100 y 500 mg L<sup>-1</sup> en acetonitrilo. Debido a la alta toxicidad de los hidrocarburos en estudio se trabajó con extrema precaución utilizando medidas de protección adecuadas.

La concentración de las soluciones patrón metanólicas de BPA y NF fueron de 500 mg L<sup>-1</sup>.

Todas las soluciones se almacenaron en frascos de color caramelo a una temperatura de 4 °C, para así evitar su descomposición y garantizar su estabilidad por varias semanas.

## 3.3 Soluciones de trabajo

En función del sistema en estudio, se obtuvieron soluciones de concentración intermedia a partir de las soluciones patrón. Las concentraciones de dichas soluciones, realizadas en metanol o acetonitrilo, variaron en el rango de: 0,50 a 6,00 mg L<sup>-1</sup> para los agroquímicos; 5,00 mg L<sup>-1</sup> a 2,00 mg L<sup>-1</sup> para los HPAs; y 2,50 a 5,00 mg L<sup>-1</sup> para los DEs.

Las soluciones de trabajo se prepararon inmediatamente antes de su uso midiendo alícuotas apropiadas de las soluciones intermedias, evaporando el solvente orgánico bajo una corriente de nitrógeno y adicionando el solvente de trabajo hasta volumen final en el matraz adecuado.

### 3.4 Instrumental

El instrumental analítico empleado en las diferentes etapas del trabajo experimental fue el siguiente:

- ◆ Cromatógrafo líquido HP 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) constituido por una bomba cuaternaria, un inyector manual, un detector de arreglo de diodos (DAD), un detector fluorescente (DFL), ambos Infinit Agilent 1260 (Agilent Technologies, Waldronn, Alemania), y un software HP ChemStation para el control instrumental, la adquisición y el análisis de datos.
- ◆ Cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence HGE-UV (Shimadzu, Kyoto, Japan) constituido por una bomba binaria, un inyector manual y el software LabSolutions V 5.82 para el control instrumental, la adquisición y el análisis de datos.
- ◆ Espectroluminómetro Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).
- ◆ Espectrofotómetro Beckman 120 DU 640 (Fullerton, CA, EE.UU.).
- ◆ pHmetro Orion 420 (The Scientific) equipado con electrodos combinado de membrana de vidrio y de referencia de Ag/AgCl.
- ◆ Evaporador rotatorio Laborota 4002 (Heidolph, Schwabach, Alemania).
- ◆ Baño termostatzado Lauda (Frankfurt, Alemania) RM6T.

### 3.5 Software

Los datos se analizaron utilizando las interfaces gráficas MVC2<sup>63</sup> y MVC3,<sup>64</sup> integradas a un entorno de MATLAB (MATLAB R2012a) para las calibraciones de

segundo y tercer orden, respectivamente. Dichas interfaces están disponibles en forma gratuita en internet.<sup>65,66</sup>

En el diseño de las calibraciones se empleó el programa Design-Expert 6.0.10 y los gráficos de esta tesis se realizaron con el programa de análisis de datos y gráficos SigmaPlot 12.0.

## **3.6 Determinación cromatográfica de agroquímicos con calibración de segundo orden**

### **3.6.1 Procedimiento cromatográfico**

En este experimento se utilizó el cromatógrafo líquido HP 1200 con una columna cromatográfica Poroshell 120 EC C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CS, EE.UU.) de 4,6 mm×100 mm de diámetro interno y largo, respectivamente, y partículas de 2,7 µm de tamaño y un inyector con un lazo de 20 µL de carga de muestra.

La fase móvil se introdujo en el sistema cromatográfico isocrático a una velocidad de flujo de 0,6 mL min<sup>-1</sup>.

### **3.6.2 Adquisición datos de segundo orden/tres vías**

Las matrices de datos tiempos de elución-longitudes de onda de absorción (CL-DAD) se colectaron cada 1,7 s usando longitudes de onda de 200 a 300 nm cada 0,5 nm (tamaño de las matrices = 200×199), y las matrices de datos tiempos de elución-longitudes de onda de emisión (CL-DFL) se recogieron cada 1,8 s desde 300 a 500 nm cada 1 nm (tamaño de las matrices = 199×171). En este último caso, la longitud de onda de excitación se fijó primero en un valor de 275 nm y, después de 2,5 min de iniciada la medida, se cambió automáticamente a través del software a 228 nm. Las

matrices CL-DAD y CL-DFL se guardaron en formato ASCII, y se transfirieron a una PC para su posterior tratamiento.

### 3.6.3 Muestras de calibración y validación

La Tabla 4 muestra las concentraciones de analitos usadas para la preparación de las 15 muestras del conjunto de calibración. Las concentraciones de los analitos que superponen sus bandas cromatográficas por coelución parcial, tales como FBZ, CBZ y TBZ en el cromatograma con detección fluorescente, y CBL, NFZ y NAF en el cromatograma con detección de arreglo de diodos, respetaron un diseño central compuesto. Las concentraciones de los analitos restantes se espaciaron en forma equidistante dentro del rango de trabajo.

**Tabla 4:** Concentraciones de calibración ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) de los diez agroquímicos investigados.

	DICAMBA	IMZQ	NFZ	METIOCARB	FM	TBZ	FBZ	CBZ	CBL	NAF
1	81	100	0	101	0	11	2.2	82	25	24
2	101	59	2	20	59	41	2.2	22	25	24
3	0	82	104	20	81	25	5.4	49	25	24
4	61	24	78	0	22	49	5.4	49	10	12
5	81	0	17	101	97	25	5.4	98	38	12
6	0	24	17	40	0	25	10.8	49	10	41
7	40	100	52	40	97	11	7.6	82	0	24
8	20	82	52	61	43	25	5.4	0	25	0
9	101	0	78	81	43	11	7.6	22	38	12
10	61	59	17	40	22	25	0	49	38	41
11	0	24	52	81	81	11	2.2	22	25	50
12	40	100	78	40	97	41	2.2	82	38	41
13	10	41	78	0	59	41	7.6	82	10	41
14	60	41	17	101	59	41	7.6	22	10	12
15	81	0	52	101	22	0	5.4	49	51	24

Las columnas sombreadas pertenecen a la calibración establecida por el diseño experimental.

Las concentraciones evaluadas estuvieron en el rango 0-100 ng mL<sup>-1</sup> para DICAMBA, IMZQ, NFZ, METIOCARB y FM, 0-50 ng mL<sup>-1</sup> para TBZ y CBZ, y 0-10 ng mL<sup>-1</sup> para TBZ. Estos rangos se seleccionaron considerando la importancia de determinar bajos niveles de agroquímicos en muestras de alimentos, y no se estableció la concentración máxima del rango lineal de calibración.

Se preparó un conjunto de validación de 18 muestras empleando concentraciones de analitos diferentes a las usadas en la calibración y siguiendo un diseño aleatorio. Todas las soluciones mencionadas se prepararon por duplicado.

### 3.6.4 Muestras reales

Se adquirieron muestras de lechuga repollada y mantecosa, pepino, apio y hongos champiñones (*Agaricus bisporus*) en el mercado local.

Como primer paso, cada muestra se lavó con agua destilada, cortó en pequeños fragmentos y se trituró. Se pesaron aproximadamente 5 g de cada triturado y se agregaron volúmenes conocidos de las soluciones estándares de agroquímicos, de manera de obtener concentraciones finales cercanas o menores a los correspondientes niveles máximos de residuos (MRL) permitidos por las agencias ambientales, indicados en la Tabla 5.

A cada muestra se le adicionó 2,5 mL de agua y 5,00 mL de acetato de etilo. Luego se llevaron a un baño de ultrasonido, y se centrifugaron durante 15 minutos a 4.000 rpm. Una alícuota de 3,00 mL de cada sobrenadante orgánico se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio, el residuo se reconstituyó con 3,00 mL de fase móvil, y la solución resultante se filtró en membrana de nylon de 0,22 µm de tamaño de poro antes del análisis cromatográfico.

**Tabla 5:** Niveles máximos de residuos (MRL) permitidos por agencias ambientales de los agroquímicos estudiados en alimentos.<sup>a</sup>

Acción	Agroquímico	Lechuga	Hongo	Brote alfalfa	Pepino	Apio
Fungicida	TBZ	50	1000	50	50	100
	FBZ	50	50	50	50	50
	CBZ	100	1000	100	100	100
	FM	20	20	20	200	50
Herbicida	DICAMBA	50	50	50	50	50
	IMZQ	50	50	50	50	50
	NFZ <sup>b</sup>	10	10	10 100 <sup>c</sup>	10	10
Insecticida	CBL	10	10	10	10	50
	METIOCARB	1000	100	1000	200	100
Activador de crecimiento	NAF <sup>d</sup>	10	10	10	10	50

<sup>a</sup> Los valores se expresan en ng g<sup>-1</sup>. A menos que se indique lo contrario, los valores se tomaron de la Ref. [2]. <sup>b</sup> A los compuestos que no están incluidos en los anexos de las regulaciones de la Unión Europea, tal como el NFZ, se les aplica usualmente un valor MRL de 10 ng g<sup>-1</sup>. <sup>c</sup> Se obtuvo de la Ref. [67]. <sup>d</sup> NAF es un metabolito del CBL y se indicaron los mismos límites que CBL.

## 3.7 Determinación cromatográfica de HPAs con calibración de tercer orden (datos cuadrilineales)

### 3.7.1 Equipamiento

Los experimentos cromatográficos se realizaron con un cromatógrafo Shimadzu Prominenece HGE-UV con inyector manual con un lazo de 100 µL de carga de muestra, utilizando una columna cromatográfica Poroshell 120 EC C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CS, EEUU) de 4,6 mm×50 mm de diámetro interno y largo, respectivamente, y partículas de 2,7 µm de tamaño. La temperatura de la columna se mantuvo a 27 °C por medio de un compartimiento termostatizador.

Para unir la columna al detector fluorescente se empleó un tubo de PTFE de 1,60 mm×500 mm de diámetro interno y largo, respectivamente. En las demás conexiones se utilizaron tubos de PTFE de 0,76 mm de diámetro interno. El flujo volumétrico

(FV) se mantuvo constante a  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ .

Como detector fluorescente se utilizó un espectroluminómetro Varian Cary Eclipse, con celda de flujo de cuarzo (Starna, CA, USA) de  $8 \mu\text{L}$  de volumen y  $1 \text{ mm}$  de paso óptico. El ancho de las rendijas para las longitudes de ondas de excitación y de emisión fue de  $10 \text{ nm}$  y se utilizó una sensibilidad del tubo fotomultiplicador de  $800 \text{ V}$ .

### **3.7.2 Adquisición de datos de tercer orden/cuatro vías**

Los matrices de excitación y emisión se midieron cada  $5 \text{ nm}$  en el rango de  $240\text{-}300 \text{ nm}$ , y cada  $3,75 \text{ nm}$  en el rango de  $350\text{-}480 \text{ nm}$ , respectivamente. Los sensores temporales correspondientes a cada MEEF se registraron desde  $4$  a  $17 \text{ min}$ , cada  $0,28 \text{ min}$ . Se trabajó a una velocidad de adquisición espectral de  $18.000 \text{ nm min}^{-1}$ . De esta forma, las MEEFs se obtuvieron en un tiempo de  $17$  segundos, generando un total de  $45$  matrices por experimento cromatográfico. Así, se construyó un arreglo de datos de tamaño  $45 \times 36 \times 13$ , para los modos temporal, de emisión y de excitación, respectivamente. En el modelado se trabajó con un rango reducido de longitudes de onda de emisión (entre  $350\text{-}458 \text{ nm}$ ), evitando así la contribución de la señal Rayleigh. El experimento cromatográfico se llevó a cabo en aproximadamente  $17$  minutos, bajo condiciones isocráticas.

### **3.7.3 Muestras de calibración y validación**

Se preparó un conjunto de  $22$  soluciones de calibración con los ocho analitos en estudio (Tabla 6). Doce de estas muestras correspondieron a un diseño experimental Plackett-Burman, ocho de las soluciones contuvieron a cada analito puro en

concentración intermedia, y se incluyeron una solución blanco y otra conteniendo todos los HPAs.

Las concentraciones evaluadas estuvieron en el rango de 0-100 ng mL<sup>-1</sup> para FLT, BaA, BbF, BkF, BaP, CRI y DBA y para PIR de 0-200 ng mL<sup>-1</sup>. Estos rangos se establecieron en base al análisis de linealidad fluorescencia-concentración para cada HPA investigado.

**Tabla 6:** Concentraciones de calibración para el sistema de HPAs (ng mL<sup>-1</sup>).

	<b>FLT</b>	<b>BaA</b>	<b>PIR</b>	<b>CRI</b>	<b>BbF</b>	<b>BkF</b>	<b>BaP</b>	<b>DBA</b>
1	20,0	20,0	200	100	100	20,0	100	100
2	100	20,0	40,0	20,0	100	100	100	20,0
3	20,0	20,0	40,0	100	100	100	20,0	100
4	100	100	200	20,0	100	100	20,0	100
5	20,0	100	200	20,0	100	20,0	20,0	20,0
6	100	100	40,0	100	20,0	20,0	20,0	100
7	100	100	40,0	100	100	20,0	100	20,0
8	100	20,0	200	20,0	20,0	20,0	100	100
9	20,0	100	40,0	20,0	20,0	100	100	100
10	20,0	20,0	40,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
11	100	20,0	200	100	20,0	100	20,0	20,0
12	20,0	100	200	100	20,0	100	100	20,0
13	50,0	50,0	100	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	50,0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	50,0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	100	0	0	0	0	0
18	0	0	0	50,0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	50,0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	50,0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	50,0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	50,0

En el conjunto de validación se emplearon concentraciones de analitos diferentes a las usadas en la calibración siguiendo un diseño aleatorio.

Las muestras de calibración y de validación se prepararon de igual forma: se colocaron alícuotas apropiadas de las soluciones patrón de HPAs en matraces



calibrados de 5,00 mL, se evaporó el solvente orgánico con nitrógeno y se llevó a volumen final con fase móvil.

Con el propósito de evaluar el método desarrollado en presencia de compuestos que pueden producir interferencias en el análisis, se preparó un conjunto de muestras conteniendo diferentes HPAs como potenciales interferentes: AZU, FE, IP y BjF, a una concentración de 400 g mL<sup>-1</sup>. Además de estar potencialmente presentes en las muestras evaluadas y producir efectos tóxicos similares, estos HPAs mostraron coelución cromatográfica y superposición espectral con los analitos calibrados, representando un desafío real para la presente investigación.

### 3.7.4 Muestras de aguas

Se evaluaron aguas subterráneas y de diversos arroyos, recolectadas en botellas de vidrio con tapa de PTFE y almacenadas a 4 °C hasta su análisis.

Dado que estas muestras no contenían niveles de HPAs detectables por el método desarrollado, se realizaron ensayos de recuperación, adicionándoles concentraciones conocidas de los analitos.

Las muestras se prepararon por duplicado y se filtraron a través de membranas de nylon de 0,45 µm y membranas de 0,22 µm, sucesivamente. Luego, se sometieron a una extracción en fase sólida (EFS) utilizando membranas de extracción C18 (Empore, Supelco, Bellefonte, USA). Cada disco se acondicionó previamente con 0,5 mL de metanol y 1 mL de agua ultrapura.

Se procesaron alícuotas de 20, 100 y 200 mL. La extracción se realizó con la ayuda de una bomba de vacío, lográndose un caudal de 10 mL min<sup>-1</sup>. Los compuestos orgánicos retenidos en la membrana se eluyeron con 1 mL de acetonitrilo, se evaporó el solvente con nitrógeno y se reconstituyó con 0,50 ó 1,00 mL de fase móvil. Las

soluciones obtenidas se sometieron al mismo análisis cromatográfico que las muestras de validación.

### **3.8 Determinación cromatográfica de HPAs con calibración de tercer orden (datos no cuadrilineales)**

#### **3.8.1 Equipamiento**

Los experimentos cromatográficos se realizaron en un cromatógrafo de líquidos Shimadzu Prominence HGE-UV con un inyector manual con un lazo de 50  $\mu\text{L}$  de carga de muestra y se utilizó una columna cromatográfica Poroshell 120 EC C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CS, EEUU) de 4,6 mm $\times$ 50 mm de diámetro interno y largo, respectivamente, y partículas de 2,7  $\mu\text{m}$  de tamaño. La temperatura de la columna se mantuvo a 27 °C por medio de un compartimiento termostatizador de columna.

Todas las muestras se prepararon en fase móvil acetonitrilo:agua (90:10 v/v) y luego se filtraron en membrana de nylon 0,22  $\mu\text{m}$  para su inyección. Se mantuvo el flujo a 0,4 mL min<sup>-1</sup>. Como detector fluorescente se utilizó un espectroluminómetro Varian Cary Eclipse empleando una celda de flujo de cuarzo (Starna, CA, USA) de 8  $\mu\text{L}$  de volumen y 1 mm de paso óptico. También se utilizaron tubos de PEFT de 0,76 mm de diámetro interno en todas las conexiones. Los parámetros instrumentales se ajustaron de la siguiente manera: ancho de ranura para las longitudes de onda de excitación y de emisión de 10 nm; sensibilidad del fotomultiplicador de 800 V y velocidad de adquisición espectral de 21.999 nm min<sup>-1</sup>.

#### **3.8.2 Adquisición de datos de tercer orden/cuatro vías**

Los datos cromatográficos se adquirieron desde 2 a 7,2 min cada 0,17 min y las

MEEFs en el rango de 250-290 nm cada 5 nm (excitación) y de 350-438 nm cada 4,5 nm (emisión). La medida de cada MEEF se llevó a cabo en aproximadamente 10 seg, registrando un total de 30 matrices por experimento cromatográfico. Se generó un arreglo de tres vías de tamaño 30×29×9, la primera corresponde al modo temporal, la segunda al modo emisión y la tercera al modo excitación. Cada experimento cromatográfico se realizó, bajo condiciones isocráticas, en aproximadamente 9 minutos.

### 3.8.3 Muestras de calibración y validación

Se preparó un conjunto de 13 soluciones de calibración con los analitos en estudio: BaA, CRI, BbF y BaP (Tabla 7).

**Tabla 7:** Concentraciones de calibración (ng mL<sup>-1</sup>).

	<b>BaA</b>	<b>CRI</b>	<b>BbF</b>	<b>BaP</b>
1	100	100	0	0
2	100	0	100	0
3	100	0	0	100
4	0	0	100	100
5	0	100	0	100
6	100	100	100	100
7	0	100	100	0
8	0	0	0	0
9	100	0	0	0
10	0	100	0	0
11	0	0	100	0
12	0	0	0	100
13	50,0	50,0	50,0	50,0

Se trabajó con un rango de concentraciones de 0-100 ng mL<sup>-1</sup>, teniendo en cuenta la relación lineal entre la concentración y la señal fluorescente anteriormente ensayadas. En ocho de las soluciones de calibración se siguió un diseño factorial

fraccionado, otra de las muestras contuvo a todos los analitos en concentraciones intermedias del rango de trabajo, y las cuatro soluciones restantes contuvieron solo uno de los analitos estudiados. Todas estas soluciones se prepararon en fase móvil acetonitrilo:agua (90:10 v/v).

El conjunto de veinte muestras de validación se preparó empleando concentraciones de analitos diferentes a las usadas en la calibración y siguiendo un diseño aleatorio. Con el propósito de evaluar el método desarrollado en presencia de compuestos que pueden producir interferencias en el análisis, se preparó un conjunto de muestras conteniendo cinco potenciales interferentes, que pueden también estar presentes en este tipo de muestra:<sup>68-70</sup> FEN, ANT, PIR, BkF y DBA. Como se verá en la sección Resultados y discusión (página 109), estos HPAs muestran una clara superposición espectral y temporal con los analitos en estudio, convirtiendo a este sistema en un importante desafío quimiométrico. Los analitos interferentes se añadieron a las muestras en concentraciones variables hasta un valor máximo de 300 ng mL<sup>-1</sup>.

### 3.8.4 Muestras de té

Se adquirieron muestras comerciales de diferentes marcas de té de producción local. Como primer paso, las muestras de té se trituraron y secaron en estufa a 100 °C. Con el propósito de extraer los analitos presentes, a 0,5 g de cada triturado se le adicionaron 5 mL de hexano. Posteriormente, se llevó cada mezcla a vortex por 20 segundos y sonicó por 30 minutos a 35 °C. Seguidamente, cada muestra se centrifugó a 2.500 rpm por 30 minutos. Luego se separó el sobrenadante orgánico y se filtró en membrana de nylon de 0,22 µm de tamaño de poro. Se tomaron 3,00 mL del filtrado para su evaporación a sequedad en un evaporador rotatorio. Finalmente, el residuo se

reconstituyó con 1,00 mL de fase móvil para su análisis cromatográfico.

### 3.8.5 Método de referencia

Con el propósito de validar la nueva técnica desarrollada, los resultados se contrastaron frente a una metodología de referencia, que consistió en el análisis con CG-EM basado en el procedimiento propuesto por Orecchio y col.<sup>71</sup> Se tomó 1 mL del mismo sobrenadante orgánico de la extracción de té anteriormente mencionada, se lo evaporó hasta sequedad y al residuo se lo reconstituyó en 0,50 mL de hexano. Se inyectó 1  $\mu$ L de esta solución en el cromatógrafo y se empleó helio como gas portador a un flujo de 1,4 mL min<sup>-1</sup>. La temperatura del inyector se mantuvo a 280 °C y la energía de ionización del detector fue 70 eV. Se empleó un gradiente de temperatura de la siguiente manera: se mantuvo la temperatura constante a 90 °C durante dos primeros minutos, desde el minuto 2 hasta el 45 se aplicó un incremento de 5 °C por minuto hasta alcanzar los 310 °C, para luego continuar a temperatura constante de 310 °C y finalizar a los 60 minutos.

Se utilizó el modo scan para la identificación de los analitos, mientras que para la cuantificación se aplicó el monitoreo del ion molecular (BaA y CRI  $m/z$  228 y para BbF y BaP  $m/z$  252). Cada muestra de té se preparó por duplicado.

## 3.9 Determinación de HPAs con calibración de tercer orden utilizando degradación de Fenton

### 3.9.1 Adquisición de datos de tercer orden/cuatro vías

Los experimentos fluorescentes se realizaron en un espectroluminómetro Varian Cary Eclipse. La adquisición de los datos se realizó con software Cary Eclipse. Los datos de excitación y emisión se midieron cada 4 nm en el rango de 240-328 nm y

cada 3,33 nm en el rango de 370-470 nm, respectivamente. Los sensores temporales se registraron de 0-4,2 min, cada 0,42 min. Se empleó una velocidad de adquisición espectral de  $16.000 \text{ nm min}^{-1}$ .

### 3.9.2 Muestras de calibración y validación

Se preparó un conjunto de 15 soluciones de calibración con los cinco analitos en estudio (Tabla 8). Doce de estas muestras correspondieron al diseño experimental Plackett-Burman, dos de las restantes soluciones fueron blancos y la última muestra incluyó los cinco HPAs a concentraciones intermedias.

Las concentraciones evaluadas estuvieron en el rango de  $0-70 \text{ ng mL}^{-1}$  para DBA, BbF y BaA, y en el rango de  $0-45 \text{ ng mL}^{-1}$  para BaP y BkF. Estos rangos se establecieron en base al análisis de linealidad fluorescencia-concentración para cada HPA investigado.

**Tabla 8:** Concentraciones de calibración de los HPAs ( $\text{ng mL}^{-1}$ ).

	<b>BaP</b>	<b>DBA</b>	<b>BbF</b>	<b>BkF</b>	<b>BaA</b>
1	10,7	69,4	69,4	39,7	19,8
2	43,6	69,4	69,4	9,9	69,4
3	10,9	69,4	69,4	9,9	69,4
4	10,7	69,4	19,8	9,9	19,8
5	10,9	19,8	19,8	39,7	69,4
6	43,6	19,8	19,8	9,9	69,4
7	10,7	19,8	19,8	9,9	19,8
8	43,6	19,8	69,4	9,9	19,8
9	10,7	19,8	69,4	39,7	69,4
10	43,6	69,4	19,8	39,7	69,4
11	43,6	69,4	19,8	39,7	19,8
12	43,6	19,8	69,4	39,7	19,8
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	21,4	34,7	34,7	19,8	34,7

El conjunto de muestras de validación se preparó empleando concentraciones de analitos diferentes a las usadas en la calibración y siguiendo un diseño aleatorio.

Las muestras de calibración y de validación se prepararon de igual forma: se colocaron alícuotas apropiadas de las soluciones patrón de HPAs en matraces calibrados de 2,00 mL y se evaporó el solvente orgánico con nitrógeno. Luego se adicionó la cantidad necesaria de solución de M- $\beta$ -CD para obtener una concentración final de 0,01 mol L<sup>-1</sup> y solución reguladora acetato de sodio/ácido acético (pH = 5,  $C_{\text{final}} = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ), llevando a volumen final con agua ultra pura.

Con el propósito de evaluar el método desarrollado en presencia de compuestos que pueden producir interferencias en el análisis, se prepararon dos conjuntos de muestras conteniendo potenciales interferentes.

Uno de ellos se constituyó con diez muestras conteniendo los HPAs PIR, CRI y FLT, y los agroquímicos FBZ, TBZ, NAF y 1-ANA, que poseen señales fluorescentes muy superpuestas con los de los analitos investigados. A este grupo de muestras, que denominamos conjunto de prueba N° 1, se lo ensayó en el siguiente rango de concentraciones: NAF, FLT, TBZ y 1-ANA de 0-300 ng mL<sup>-1</sup>, PIR y CRI de 0-200 ng mL<sup>-1</sup> y FBZ de 0-50 ng mL<sup>-1</sup>.

El segundo grupo de muestras evaluadas (conjunto de prueba N° 2) estuvo constituido por cinco fluoroquinolonas (CIPRO, DANO, ENRO, LOME y NOR) en concentraciones de 200 a 500 ng mL<sup>-1</sup>. Las fluoroquinolonas son agentes antimicrobianos que a menudo se encuentran en las aguas superficiales. Una característica de este grupo de potenciales interferentes es la similitud de su perfil de emisión con uno de los analitos de estudio, representando la cuantificación de este último un importante desafío quimiométrico.

Los conjuntos de prueba se prepararon colocando las correspondientes alícuotas de analitos e interferentes en matraces de 2,00 mL, se evaporó el solvente orgánico se adicionaron soluciones de M- $\beta$ -CD ( $C_{\text{final}} = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ) y solución reguladora (pH = 5) y se enrazó hasta volumen final con agua ultra pura.

### 3.9.3 Muestras de aguas

Se evaluaron aguas de diferentes orígenes geográficos. Las muestras se recolectaron en botellas de vidrio con tapa de polifluoretileno y se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

Las muestras reales de agua evaluadas no contenían niveles de HPAs detectables por el método desarrollado (aun después de la preconcentración) y por este motivo se realizaron ensayos de recuperación, adicionando concentraciones conocidas de los analitos a las muestras de aguas antes de filtrarlas.

Aunque las muestras contenían cantidades significativas de ácidos húmicos y sustancias proteicas, con el propósito de simular matrices reales más complejas se añadieron, además, HPAs, agroquímicos y fluoroquinolonas utilizados en los conjuntos de prueba.

Con el fin de alcanzar niveles de concentraciones de HPAs en el orden de las partes por trillón, las muestras de aguas se sometieron a una EFS utilizando membranas de extracción C18.

Ensayos preliminares de extracción con diferentes volúmenes de soluciones de los analitos en agua destilada indicaron una eficiencia de alrededor del 100 %. Las membranas se colocaron en un soporte de acero inoxidable de 13 mm de diámetro acoplado a una jeringa de vidrio (Alltech, Deerfield, IL, EE.UU.). Antes del agregado de la muestra, las membranas se activaron primero con metanol y luego con agua



ultra pura.

Se procesaron alícuotas de 100-500 mL de muestras acuosas. La extracción se realizó con la ayuda de una bomba de vacío, lográndose un caudal de  $30 \text{ mL min}^{-1}$ . Los compuestos orgánicos retenidos en la membrana se eluyeron con 1,5 mL de acetonitrilo, se evaporó el solvente con nitrógeno y se reconstituyó la solución con M- $\beta$ -CD ( $C_{\text{final}} = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ), solución reguladora ( $\text{pH} = 5$ ) y agua ultra pura hasta un volumen final de 2,00 mL. Finalmente, se midieron los datos C-MEEF de cada muestra y se estimaron las concentraciones de HPAs utilizando calibración de tercer orden/cuatro vías.

### 3.9.4 Medidas analíticas

La celda de cuarzo conteniendo la solución de trabajo (muestras de calibración, validación o con interferentes) se colocó en el portacelda del espectrofluorímetro a  $20^\circ\text{C}$ . Luego se adicionaron  $10 \text{ }\mu\text{L}$  de solución de sulfato amónico ferroso  $2.000 \text{ mg L}^{-1}$  ( $C_{\text{final Fe(II)}} = 2 \text{ mg L}^{-1}$ ) y  $7 \text{ }\mu\text{L}$  de solución de peróxido de hidrógeno de  $1.400 \text{ mg L}^{-1}$  ( $C_{\text{final H}_2\text{O}_2} = 5 \text{ mg L}^{-1}$ ), dando inicio a la reacción de Fenton. Se midieron las MEEFs a diferentes tiempos de reacción, obteniéndose los datos de tercer orden para la correspondiente calibración.

## 3.10 Determinación de DEs con calibración de tercer orden utilizando degradación de Fenton

### 3.10.1 Adquisición de datos de tercer orden/cuatro vías

Las MEEFs se registraron en un espectroluminómetro Varian Cary Eclipse, conectado en serie a una computadora a través de una interfaz IEEE 488. La adquisición de los datos se realizó utilizando el software del equipo. Los datos

C-MEEF se adquirieron de la siguiente manera: emisión en el rango 290-350 nm cada 3,75, excitación en el rango 210-260 nm cada 2 nm, y tiempo en el rango 0-4,5 minutos cada 0,30 minutos.

La velocidad de adquisición espectral fue de  $18.000 \text{ nm min}^{-1}$ , permitiendo así el registro de cada MEEF en un tiempo significativamente menor al tiempo involucrado entre medidas sucesivas. El voltaje del tubo fotomultiplicador se configuró a 600 V y los anchos de rendijas de excitación y emisión a 5 nm. La temperatura de la celda se mantuvo a 30 °C.

### 3.10.2 Muestras de calibración y validación

Se preparó un conjunto de once muestras de calibración, con concentraciones de los analitos en el rango  $0\text{-}200 \text{ ng mL}^{-1}$ , de acuerdo al análisis de linealidad fluorescencia-concentración de ambos analitos. Diez de estas muestras se correspondieron con las concentraciones proporcionadas por un diseño central compuesto con un replicado del punto central. La muestra remanente fue una solución blanco (Tabla 9). Las soluciones acuosas de calibración se prepararon diariamente a partir de las soluciones metanólicas diluidas: se tomaron alícuotas adecuadas, se evaporó el solvente orgánico con nitrógeno seco, se adicionó M- $\beta$ -CD ( $C_{\text{final}} = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) y una solución reguladora de fostato ácido de sodio/fostato diácido de sodio ( $\text{pH} = 3,5$ ) y se llevó a un volumen final de 2 mL con agua ultrapura. Las dieciocho muestras de validación se prepararon de manera similar siguiendo un diseño aleatorio con concentraciones de los analitos diferentes a las utilizadas en la calibración.

**Tabla 9:** Concentraciones de calibración (ng mL<sup>-1</sup>).

	<b>BPA</b>	<b>NF</b>
1	200	100
2	175	175
3	100	100
4	25	25
5	25	175
6	100	200
7	100	100
8	175	25
9	100	0
10	0	100
11	0	0

### 3.10.3 Muestras de plásticos

El método desarrollado se aplicó a diferentes muestras (vasos, bandejas, bolsas, bols y botellas) fabricadas con materiales plásticos que pueden contener BPA y NF. Entre estos materiales podemos mencionar al poliestireno expandido (PS-E), polietileno de alta densidad (PEAD), policarbonato (PC), polietileno (PET) y polipropileno (PP).

Cada muestra de plástico se cortó en pequeños fragmentos y según el material se pesó de 0,2 a 0,7 g. Luego, el material triturado se llevó a reflujo con la cantidad de etanol adecuado (3-10 mL) durante una hora a 35 °C, en oscuridad y bajo atmósfera inerte de nitrógeno. Finalizado este proceso la mezcla se centrifugó y el sobrenadante se dividió en varias alícuotas para su posterior análisis por el método desarrollado y el de referencia.

Se tomaron de 1 a 3 mL de sobrenadante, se evaporó el solvente a presión reducida, y se adicionaron alícuotas de la solución reguladora y M-β-CD, hasta

obtener las concentraciones finales de trabajo. Los datos C-MEEFs se adquirieron de igual manera que en las muestras de validación.

### 3.10.4 Método de referencia

Las medidas cromatográficas del método de referencia se realizaron en un cromatógrafo líquido HP 1200 a un flujo de  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ , un inyector manual con un lazo de  $50 \text{ }\mu\text{L}$  de carga de muestra, una columna cromatográfica Eclipse XDB-C18 de  $4,6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$  de diámetro interno y largo, respectivamente, y partículas de  $5 \text{ }\mu\text{m}$  de tamaño. Se utilizó un detector fluorescente que registró la señal a  $306 \text{ nm}$  excitando el eluato a una longitud de onda de  $207 \text{ nm}$ .

El análisis por CLAE de las muestras de plásticos se realizó evaporando con nitrógeno hasta sequedad  $200 \text{ }\mu\text{L}$  del sobrenadante etanólico, proveniente del procedimiento antes detallado, disolviendo el residuo con una solución de agua:metanol (30:70 v/v), e inyectando dicha solución en el cromatógrafo. Las condiciones en que se llevó a cabo este experimento se establecieron en base a una técnica propuesta en la literatura:<sup>20</sup> de 0-4 min, elución isocrática con 30 % agua-70 % metanol, de 4-10 min se aplicó un gradiente lineal desde 30 % agua-70% metanol a 10 % agua-90% metanol, 10 a 17 min nuevamente elución isocrática con 10 % agua-90% metanol, y de 17 a 25 min se volvió a las condiciones iniciales.

### 3.10.5 Medidas analíticas

La reacción de Fenton tuvo lugar dentro de la celda de lectura, donde a cada solución de calibración o validación se le adicionaron  $7 \text{ }\mu\text{L}$  de una solución de sulfato amónico ferroso de  $3.000 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $C_{\text{inicial Fe(II)}} = 1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y  $10 \text{ }\mu\text{L}$  de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno de concentración  $1.800 \text{ mg mL}^{-1}$

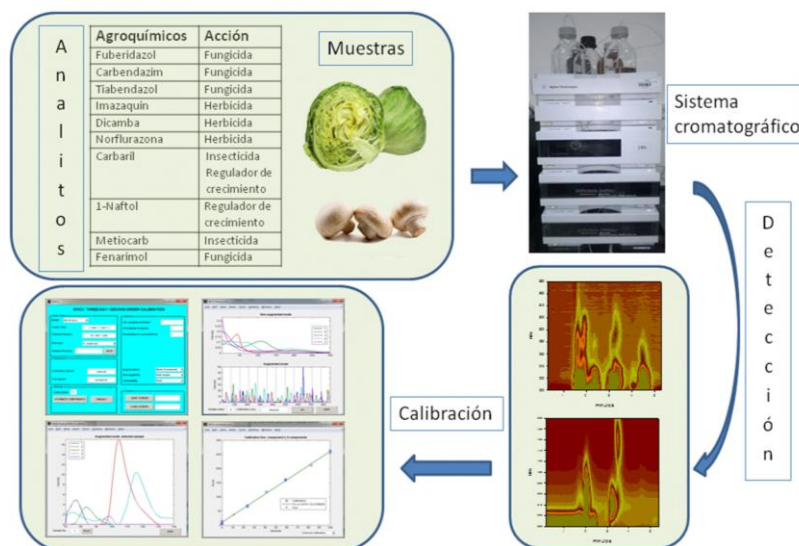
( $C_{\text{inicial H}_2\text{O}_2} = 9,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Los datos de tercer orden de cada muestra se generaron midiendo las MEEFs a diferentes tiempos durante la degradación de Fenton, y luego se analizaron con calibración de tercer orden/cuatro vías.



## Resultados y discusión

## 4 Resultados y discusión

### 4.1 Método analítico verde aplicado a la determinación de residuos de agroquímicos en muestras vegetales



En esta primera etapa de tesis, se desarrolló una nueva estrategia que incluyó datos de segundo orden obtenidos por CLAE acoplada a dos detectores en serie (DAD y DFL) para la cuantificación simultánea de diez agroquímicos. Se evaluaron los siguientes compuestos: TBZ, FBZ, CBZ, FM (fungicidas), DICAMBA, IMZQ, NOR (herbicidas), CBL, METIOCARB (insecticidas) y NAF (activador de crecimiento).

El uso de la doble detección cromatográfica posibilitó la selección de la señal apropiada para cada analito (absorbancia y/o fluorescencia), y la aplicación de calibración multivariada con datos de segundo orden permitió obtener las ventajas propias de este tipo de calibración: resolución matemática de bandas cromatográficas parcial o totalmente solapadas y cuantificación en presencia de potenciales interferentes (ventaja de segundo orden).

Se obtuvieron las matrices tiempo de elución-longitud de onda de emisión de fluorescencia a dos longitudes de onda de excitación distintas, mejorando

notablemente la sensibilidad del análisis para los compuestos fluorescentes.

El algoritmo utilizado en el procesamiento de los datos, MCR-ALS, permitió lograr una excelente selectividad en un sistema complejo.

El método se aplicó a diferentes muestras de vegetales que potencialmente están en contacto con los agroquímicos investigados, incluyendo hongos, dos variedades de lechuga, brotes de alfalfa, pepino y apio. El tratamiento de dichas muestras fue muy sencillo y el análisis cromatográfico, bajo condiciones isocráticas, se llevó a cabo en un corto tiempo con resultados muy favorables.

#### **4.1.1 Consideraciones generales**

Dado que el procesamiento de datos se lleva a cabo a través de calibración multivariada, no se requiere alcanzar el principal objetivo de un análisis cromatográfico clásico que es la resolución completa de los componentes de la muestra. En efecto, el presente trabajo se desarrolló teniendo en cuenta los principios de la QAV y no las condiciones que producen una separación completa de las bandas cromatográficas. Es por ello que las variables experimentales se optimizaron con el propósito de acortar los tiempos de elución, tanto como fuera posible, con la concomitante disminución del consumo de solventes orgánicos tóxicos.

De acuerdo a experimentos previos,<sup>72</sup> se probaron fases móviles conteniendo diferentes relaciones de acetonitrilo y solución reguladora. El sistema en estudio está constituido por un conjunto de agroquímicos pertenecientes a distintas familias químicas de compuestos de relativamente baja polaridad, y con diferentes propiedades ácido-base (Tabla 10). Por lo tanto, la selección del pH de la fase móvil juega un rol importante en los tiempos de retención cromatográfica. Se corroboró que fases móviles de  $\text{pH} > 4$  rindieron largos tiempos de elución y, por otro lado, se



evitaron pHs menores a 2 para prolongar la vida útil de la columna C18. Por lo tanto el rango de pH evaluado se restringió entre 2 y 4, que resultó además adecuado en relación a la estabilidad de los analitos.

Como resultado, la composición de la fase móvil seleccionada se constituyó con acetonitrilo y solución reguladora de fostato (pH = 2,8) en proporción 60:40 v/v, empleada en modo isocrático, a una velocidad de flujo de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, resultando un tiempo cromatográfico total menor a 5 minutos por experimento.

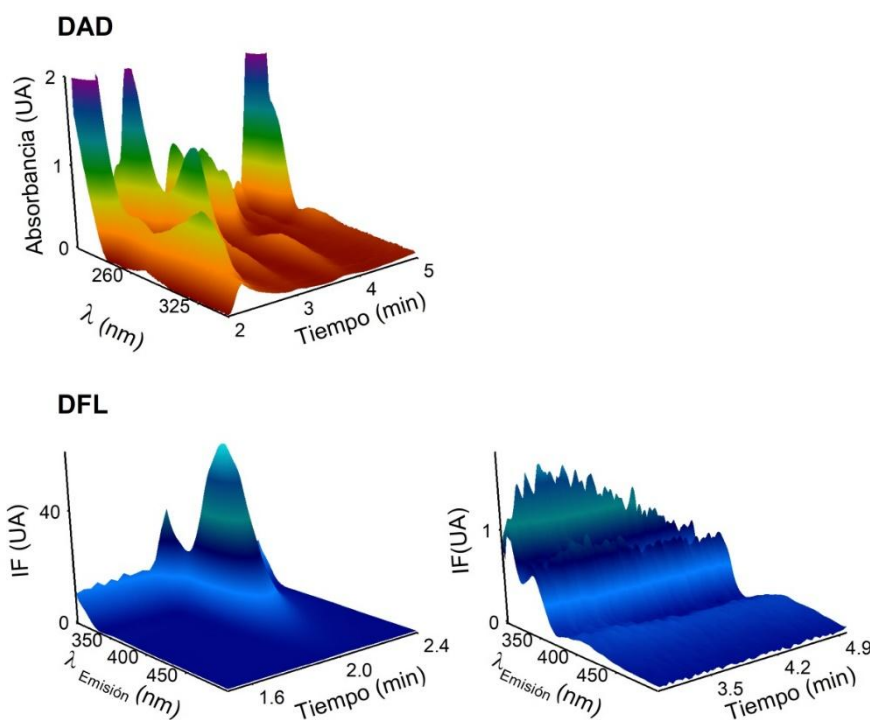
**Tabla 10:** Familias químicas, funciones y constantes de disociación de los agroquímicos estudiados.

Nombre	Modo de acción	Familia química	pKa	Ref.
Fuberidazol (FBZ)	Fungicida	Bencimidazol	pKa1 = 5,0 pKa2 = 11,7	73
Carbendazima (CBZ)	Fungicida	Bencimidazol	pKa1 = 4,3 pKa2 = 10,8	73
Tiabendazol (TBZ)	Fungicida	Benzamidazol	pKa1 ~ 0,5 pKa2 = 4,8 pKa3 = 11,3	73
Imazaquin (IMZQ)	Herbicida	Imidazolinona	pKa1 ~ 0,5 pKa2 = 4,8 pKa3 = 11,3	74
DICAMBA	Herbicida	Ac. Benzoico	pKa = 2,4	75
Norflurazona (NFZ)	Herbicida	Piridazinona	No se disocia en el rango de pH 1-12	76
Carbaril (CBL)	Insecticida Reg. de crecimiento	Carbamato	pKa = 12,02	77
1-Naftol (NAF)	Reg. de crecimiento	Auxina	pKa = 9,4	78
METIOCARB	Insecticida	Carbamato	pKa = 12,16	79
Fenarimol (FM)	Fungicida	Pirimidina	pKa1 = 1,67 pKa2 = 11,23	80

En las condiciones anteriormente especificadas, los fungicidas bencimidazólicos (TBZ, FBZ y CBZ) en sus formas protonadas emergen primero, seguidos por DICAMBA (en parte negativamente cargado) y las estructuras neutras de IMZQ, CBL, NFZ, NAF, METIOCARB y FM.

Considerando la complejidad del sistema estudiado, conformado por compuestos con diferentes propiedades espectroscópicas, se decidió realizar una detección dual empleando en forma simultánea el dispositivo de arreglo de diodos (DAD) y el detector de fluorescencia (DFL). Esta configuración posee como ventaja que la detección UV permite determinar un amplio número de componentes, y la detección fluorescente aporta mayor sensibilidad y selectividad para aquellos compuestos que manifiestan dicha propiedad.

Las matrices de datos tiempos de elución-longitudes de onda de absorción (CL-DAD) y tiempos de elución-longitudes de onda de emisión (CL-DFL), mostradas en la Figura 7, se midieron tanto en las muestras de calibración como en las de validación.



**Figura 7.** Gráficos tridimensionales DAD y DFL. Para una mejor visualización se divide el gráfico FDL en dos partes.

Los datos de segundo orden provenientes de medidas cromatográficas para muestras complejas de multicomponentes se pueden clasificar como no-trilineales de

tipo 1, dado que los perfiles de elución no son constantes entre medidas sucesivas.<sup>46</sup>

El arreglo tridimensional construido con datos tipo 1 para un número de muestras puede desdoblarse en una matriz aumentada que preserva la propiedad de bilinealidad, si la dirección del desdoblamiento corresponde al perfil que sufre el cambio (tiempo de elución en el presente caso). MCR-ALS es un algoritmo quimiométrico muy difundido y capaz de resolver esta situación, y es por ello que se seleccionó para el procesamiento de los datos.<sup>59</sup>

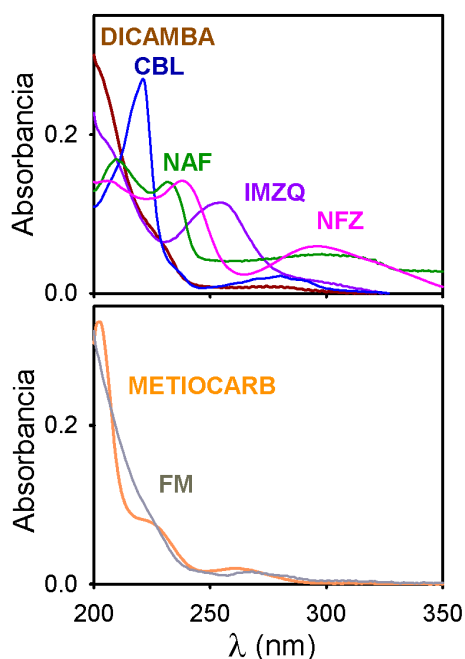
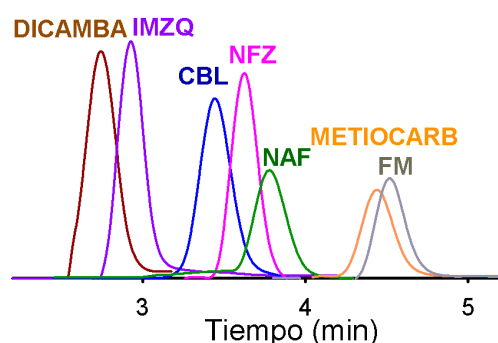
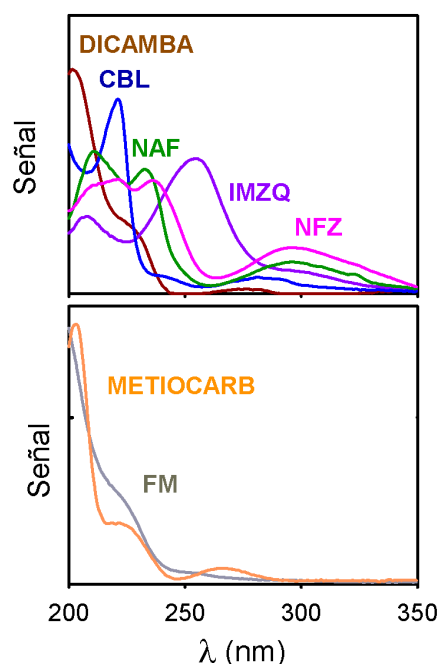
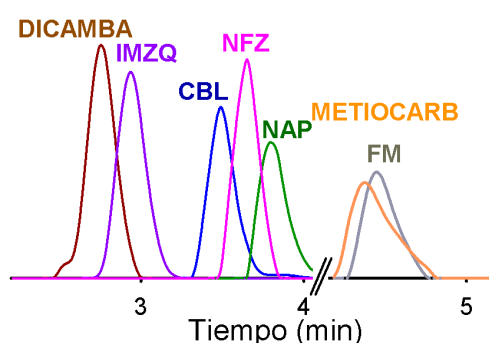
Es necesario aclarar que si los espectros UV o fluorescentes de los analitos fueran suficientemente distintos entre sí, los cromatogramas se podrían procesar en el rango total de tiempo. Sin embargo, como suele ocurrir en sistemas multicomponentes, es muy probable que existan similitudes espectrales entre los analitos. En este caso, si se procesaran los cromatogramas completos, se obtendrían resultados poco satisfactorios debido a que el pseudorango matemático sería menor que el rango químico.<sup>59</sup> Como se verá más adelante, para evitar este problema, MCR-ALS se aplicó en rangos de tiempo seleccionados de forma tal de asegurar que cada región cromatográfica parcial incluya analitos con perfiles espectrales distintos.

Para mayor claridad, a continuación se discutirán separadamente las características de las matrices CL-DAD y CL-DFL obtenidas en el sistema bajo estudio. Sin embargo, no se debe perder de vista que dichas matrices se obtuvieron en un mismo experimento cromatográfico en cada muestra evaluada.

#### **4.1.2 Matrices tiempo de elución-DAD**

En la Figura 8 se muestran los perfiles cromatográficos y espectrales de los analitos detectados por DAD en una muestra de validación. Los bencimidazoles (FBZ, CBZ y TBZ) co-eluyen con la intensa banda de inyección, y no se

determinaron por DAD. El primer analito cuya banda se separa del pico de inyección en el cromatograma DAD es DICAMBA, seguido de IMZQ, CBL, NFZ, NAF, METIOCARB y FM, con diferentes grados de superposición. Entre estos compuestos, CBL y NAF poseen propiedades fluorescentes, y por lo tanto se evaluaron también por fluorescencia.

**(A) EXPERIMENTAL****(B) MCR-ALS**

**Figura 8.** Perfiles temporales y espectrales de los analitos obtenidos experimentalmente por DAD (A) y modelados por MCR-ALS (B) para una muestra de validación. La señal de absorbancia se encuentra normalizada.

Se comprobó que los perfiles espectrales de DICAMBA y FM son muy similares (Figura 8A), razón por la cual se decidió trabajar con el algoritmo en dos regiones temporales diferentes, dividiendo la matriz-DAD en dos submatrices: una

conteniendo la señal de IMZQ, CBL, NFZ y NAF, y la otra la de METIOCARD y FM.

Para el análisis con MCR-ALS, las matrices CL-DAD de cada muestra de validación se aumentaron con las correspondientes matrices de calibración. La inicialización del algoritmo se realizó estimando las llamadas variables más puras en el dominio espectral, y la descomposición posterior se llevó a cabo utilizando las restricciones de no-negatividad en ambos modos y la de unimodalidad en el modo temporal.

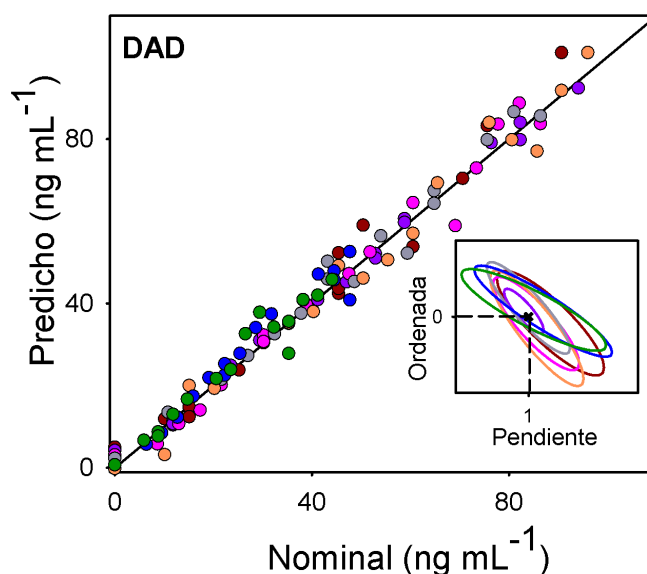
El número de componentes del sistema se estimó utilizando análisis de componentes principales (PCA) y se justificó considerando las señales de los analitos y del blanco.

El criterio de convergencia ALS fue de 0,01 % (cambio relativo en el ajuste para iteraciones sucesivas). En las muestras de validación la convergencia se alcanzó con menos de 20 iteraciones. El ajuste de los residuos fue de aproximadamente 0,05 mA (mili unidades de absorbancia). Después de la convergencia, los analitos se identificaron y cuantificaron por medio de las correspondientes curvas pseudo-univariadas.

En la Figura 8B se pueden observar los perfiles espectrales y temporales modelados por MCR-ALS para una muestra de validación. Como se puede apreciar aunque el sistema es complejo, tanto las señales espectrales como las bandas cromatográficas se pueden distinguir claramente.

Los resultados de predicción para los compuestos analizados en el conjunto de las 16 muestras de validación (Figura 9) están en concordancia con los correspondientes valores nominales. Si se analizan las regiones elípticas de confianza conjunta

(EJCRs, por las siglas en inglés de elliptical joint confidence regions)<sup>81</sup> para las pendientes y ordenadas al origen de las rectas anteriores (recuadro interior de la Figura 9), concluimos que las elipses incluyen al valor teórico esperado (pendiente = 1, ordenada al origen = 0), indicando la exactitud de la metodología empleada.



**Figura 9.** Gráfico de concentraciones predichas vs nominales de DICAMBA (marrón), CBL (azul), NAF (verde), IMZQ (violeta), NFZ (rosa), METIOCARB (naranja) y FM (gris) en muestras de validación utilizando DAD. El recuadro interno muestra las regiones elípticas de confianza conjunta.

Los resultados estadísticos correspondientes a las muestras de validación se completan con los parámetros mostrados en la Tabla 11. Es necesario puntualizar que los límites de detección (LDs) se calcularon usando una expresión rigurosa, recomendada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC):<sup>82</sup>

$$LD = 3,3(\text{SEN}^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \text{SEN}^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \sigma_{y_{cal}}^2)^{1/2} \quad (9)$$

donde SEN es el componente sensibilidad,  $\sigma_x^2$  es la varianza en la señal instrumental,  $h_0$  representa la leva cuando la concentración del analito que se desea detectar es igual a cero,  $\sigma_{y_{cal}}^2$  es la varianza en las concentraciones de calibración, y el factor 3,3 es la suma de los coeficientes  $t$  para errores tipo I (falsos detectables) y tipo II (falsos

no detectables) con un intervalo del confianza de 95%.<sup>47</sup>

**Tabla 11:** Resultados estadísticos para los agroquímicos en las muestras de validación, determinados con DAD y DFL.

	DICAMBA	IMZQ	NFZ	METIOCARB	FM	TBZ	FBZ	CBZ	CBL	NAF
<b>DAD</b>										
ECMP	5	2	4	5	3				4	4
ERP	10	4	8	9	7				14	7
LD	4	2	2	1	1				2	3
LQ	12	6	6	3	3				10	9
<b>DFL</b>										
ECMP						2	0,2	4	2	3
ERP						9	5	7	7	11
LD						1	0,2	3	1	1
LQ						3	0,6	9	3	3

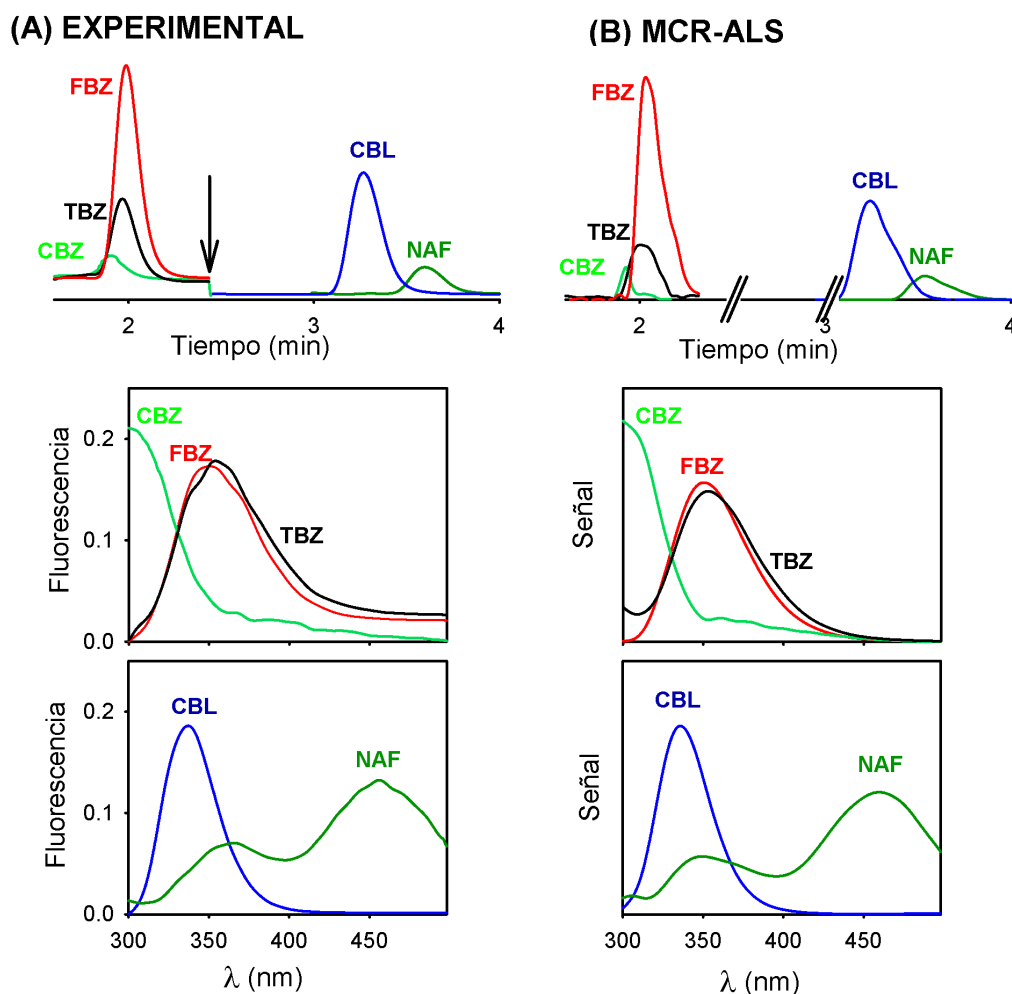
<sup>a</sup> ECMP (ng mL<sup>-1</sup>), error cuadrático medio de la predicción; ERP (%), error relativo de la predicción; LD (ng mL<sup>-1</sup>), límite de detección, LQ (ng mL<sup>-1</sup>), límite de cuantificación, parámetros calculados según Ref. [82].

### 4.1.3 Matrices tiempo de elución-DFL

Los compuestos TBZ, FBZ, CBZ, CBL y NAF se determinaron mediante sus señales fluorescentes. Debe notarse que, a diferencia de lo que ocurre en el cromatograma DAD, en este caso la señal de la inyección no interfiere con las bandas de los tres primeros analitos. La Figura 10A muestra un cromatograma con detección fluorescente y los espectros de emisión de los analitos fluorescentes. Como se puede observar, se distinguen claramente dos regiones en el eje tiempo: la primera alrededor de los dos minutos conteniendo a los analitos TBZ, FBZ y CBZ, y otra entre 3 y 4 minutos incluyendo a CBL y NAF.

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad del método, se implementó una nueva estrategia: los datos de emisión fluorescente se obtuvieron irradiando cada muestra

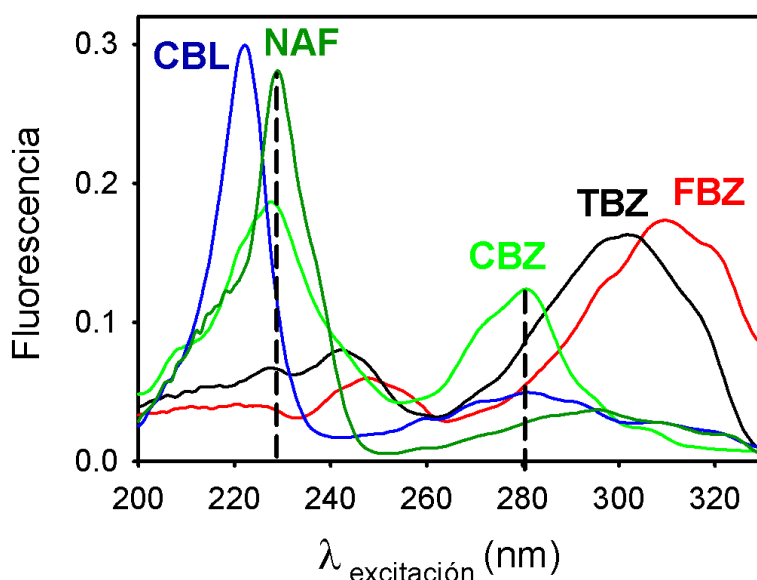
secuencialmente a dos longitudes de onda de excitación óptimas.



**Figura 10.** Perfiles cromatográficos y espectrales de los analitos obtenidos de manera experimental (A) y modelados por MCR-ALS (B) para una muestra de validación. Las señales fluorescentes se encuentran normalizadas.

Como se observa en la Figura 11, las bandas de excitación para los primeros analitos emergentes (TBZ, FBZ y CBZ) aparecen en el rango 260-330 nm, mientras CBL y NAF poseen máximos de excitación entre 200-250 nm. Este hecho nos dió la posibilidad de elegir una longitud de onda de excitación adecuada para cada región cromatográfica. Específicamente, la longitud de onda de excitación primero se fijó a 280 nm, favorable a CBZ que es el menos fluorescente del grupo, y después de 2,5 min el valor cambió automáticamente a 228 nm, apropiado a NAF que es menos fluorescente que CBL.





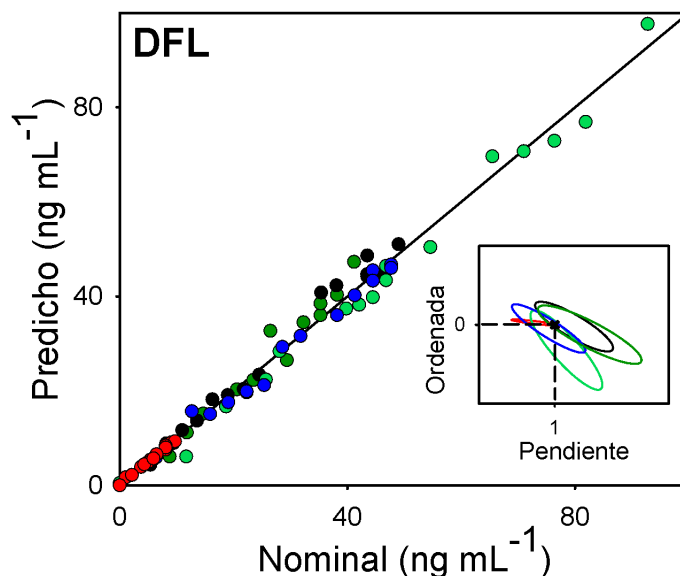
**Figura 11.** Perfiles espectrales de los analitos fluorescentes. Las líneas punteadas indican las longitudes de onda de excitación utilizadas. Las señales se encuentran normalizadas.

En la Figura 10A se observa claramente la superposición cromatográfica de las bandas de TBZ, FBZ y CBZ, así como la marcada similitud espectral entre TBZ y FBZ. Estos hechos representan un desafío quimiométrico pero, como se demostrará, el problema se pudo resolver usando restricciones adecuadas durante el ajuste de MCR-ALS. Por otro lado, la superposición entre CBL y NAF también se resolvió a través del método quimiométrico.

El procedimiento MCR-ALS, incluyendo la selección de los componentes y las restricciones usadas, fue similar al realizado para las matrices CL-DAD. En la primera región evaluada, que incluye TBZ, FBZ y CBZ, fue esencial aplicar la restricción de correspondencia para la correcta diferenciación entre los espectros de TBZ y FBZ.<sup>59</sup> Esta restricción fuerza a los sub-perfiles del analito en el modo aumentado de tiempo de elución a ser cero para muestras donde dicho analito está ausente.

Los ajustes de los residuos para el análisis de CL-DFL fue aproximadamente de 0,01 UF (unidades arbitrarias de fluorescencia), que representa el 1% con respecto a

la medida de intensidad máxima. Después de la convergencia, la cuantificación de los analitos se realizó a partir de las correspondientes curvas de pseudo-primer orden.



**Figura 12.** Gráfico de concentraciones predichas vs nominales de CBZ (verde claro), CBL (azul), TBZ (negro), FBZ (rojo) y NAF (verde oscuro) en muestras de validación utilizando DFL. El recuadro muestra las regiones elípticas de confianza conjunta para las correspondientes rectas de regresión.

La Figura 10B muestra los perfiles cromatográficos y espectrales recuperados satisfactoriamente por MCR-ALS para una típica muestra de validación, y la Figura 12 expone las predicciones para los agroquímicos fluorescentes en muestras de validación. Los buenos resultados se corroboraron también por los parámetros estadísticos de la Tabla 11, página 82. En esta tabla, se evidencia la influencia positiva de la detección fluorescente en la sensibilidad del método, reflejada en los LDs entre 0,2 y 3 ng mL<sup>-1</sup>.

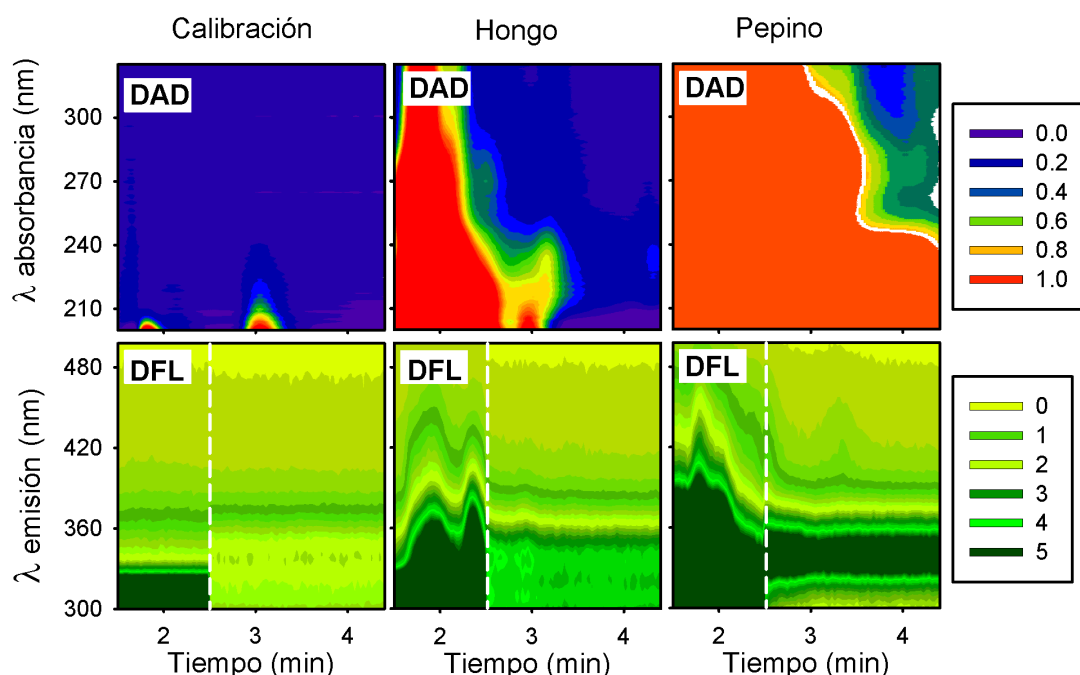
#### 4.1.4 Muestra reales

La utilidad del método propuesto se probó analizando vegetales cultivados a nivel de suelo y que son susceptibles a la contaminación por agroquímicos usados para promover y/o proteger los cultivos. Aunque los vegetales evaluados se obtuvieron de regiones donde la actividad agrícola es profusa y es probable la contaminación, en

dichas muestras no se detectó la presencia de los agroquímicos estudiados y, por lo tanto, se realizaron ensayos de recuperación.

Aunque los valores de límites máximos de residuos (MRL) para los analitos investigados se encuentran en un amplio rango de concentraciones ( $10\text{-}1000\text{ ng g}^{-1}$ , Tabla 5, página 57), los niveles ensayados no superaron los  $100\text{ ng g}^{-1}$ . Por otro lado, los buenos LQs del método propuesto evitó la necesidad de realizar etapas de pre-concentración de las muestras para la cuantificación de los valores más bajos de residuos.

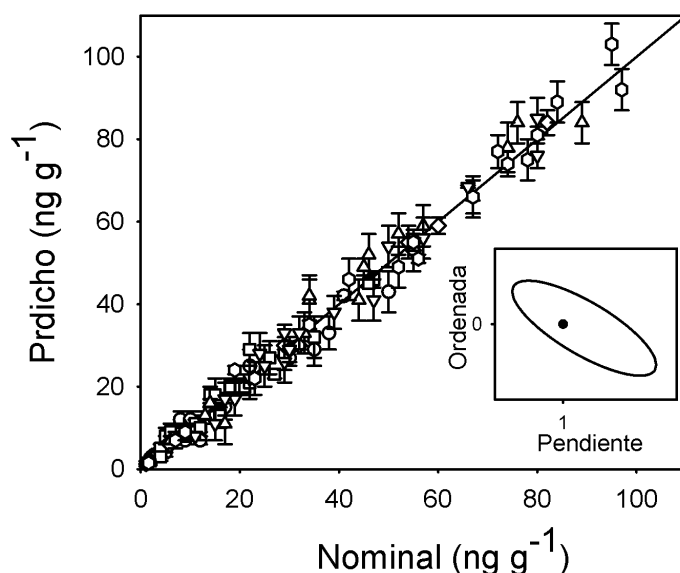
La Figura 13 muestra los gráficos de contorno de las matrices CL-DAD y CL-DFL correspondientes a las señales del blanco (sin los analitos) de una muestra de calibración y los de algunas muestras reales. En esta figura se manifiesta la complejidad de cuantificar los analitos en presencia de interferentes siguiendo las premisas de los métodos analíticos verdes.



**Figura 13.** Gráfico de contorno CL-DAD y CL-DFL de una muestra de calibración y muestra real de hongo y pepino sin el agregado de los analitos. Las líneas blancas señalan el cambio en la longitud de onda de excitación.

El procesamiento de datos con MCR-ALS en muestras reales se realizó de manera similar a las muestras de validación, pero se aplicó una restricción adicional de correspondencia a las potenciales interferencias. El perfil de dichas interferencias en el modo aumentado se forzó a cero en las muestras de calibración.

Los buenos resultados obtenidos comprobados a través del test de elipse (Figura 14) y los valores de recuperación expuestos en la Tabla 12 sugieren que ni los constituyentes naturales ni otros compuestos eventualmente presentes en las muestras estudiadas interfieren en el análisis.



**Figura 14.** Representación de los valores predichos versus valores nominales de los analitos en todas las muestras reales. El recuadro interno muestra la correspondiente región elíptica de confianza conjunta.

**Tabla 12:** Recuperación de analitos en muestras reales adicionadas utilizando DAD y DFL.

	DAD					DFL				
	DICAMBA	IMZQ	NFZ	METIOCARB	FM	TBZ	FBZ	CBZ	CBL	NAF
<b>Hongos</b>										
Nominal	50	41	17	20	22	8	2,7	16	19	12
Predicho	43(5)	42(1)	15(3)	20(2)	25(4)	12(2)	3,4(0,7)	13(3)	19(1)	7(1)
Recuperado	86	102	88	100	113	150	126	81	100	58
Nominal	30	12	35	10	5	5	5	38	16	9
Predicho	27(2)	10(3)	29(4)	12(2)	6(2)	4(1)	5,9(0,5)	33(4)	17(1)	7(1)
Recuperado	90	83	83	120	120	80	118	87	106	78
<b>Lechuga repollada</b>										
Nominal	20	35	4	5	11	14	4,3	-	9	3
Predicho	20(2)	32(5)	5(1)	8(2)	11(1)	18(2)	4(1)	-	8(1)	3(1)
Recuperado	100	91	125	160	100	128	93	-	89	97
Nominal	15	47	26	15	16	27	2,1	-	3	29
Predicho	18(4)	46(2)	27(4)	13(2)	13(2)	23(1)	2,3(0,6)	-	3(1)	28(4)
Recuperado	120	98	104	87	81	85	109	-	100	97
Nominal	46	21	6	22	18	10	1,9	22	12	4
Predicho	45(1)	20(2)	9(2)	21(4)	20(2)	9(1)	2,0(0,3)	29(4)	10(1)	3(1)
Recuperado	98	95	150	95	111	90	105	131	83	75
Nominal	46	21	6	22	18	10	1,9	22	12	4
Predicho	45(1)	20(2)	9(2)	21(4)	20(2)	9(1)	2,0(0,3)	29(4)	10(1)	3(1)
Recuperado	98	95	150	105	111	90	105	131	83	75
<b>Lechuga</b>										
Nominal	55	82	60	30	54	-	5,9	55	32	29
Predicho	55(2)	84(3)	59(2)	29(3)	55(4)	-	5,9(0,2)	53(5)	30(1)	30(1)
Recuperado	100	102	98	97	102	-	100		94	103
<b>Brotes Alfalfa</b>										
Nominal	33	34	57	52	13	14	1,1	67	6	34
Predicho	33(5)	41(5)	59(5)	57(5)	13(1)	16(1)	1,5(0,4)	66(4)	7(1)	42(5)
Recuperado	100	120	103	109	100	114	136	98	116	123
Nominal	44	46	76	74	17	9	1,7	89	8	45
Predicho	41(5)	52(5)	84(5)	78(6)	11(5)	10(1)	1,8(0,2)	84(5)	8(1)	49(2)
Recuperado	93	113	110	105	65	111	106	94	100	109
<b>Pepino</b>										
Nominal	24	32	47	57	29	15	1,5	80	25	19
Predicho	28(5)	33(4)	41(5)	56(5)	26(5)	11(4)	1,9(0,5)	76(3)	25(5)	17(4)
Recuperado	116	103	87	98	90	73	126	95	100	89
Nominal	30	39	29	80	50	11	1,3	66	17	22
Predicho	29(3)	38(4)	33(2)	85(5)	54(5)	8(1)	1,7(0,1)	68(1)	17(4)	22(1)
Recuperado	97	97	114	106	108	73	130	103	100	100
<b>Apio</b>										
Nominal	78	56	80	84	23	7	1,1	97	19	34
Predicho	75(5)	51(1)	81(2)	89(5)	22(4)	7(2)	1,2(0,1)	92(5)	24(1)	35(1)
Recuperado	96	91	101	106	96	100	109	95	126	103
Nominal	74	67	72	-	52	9	1,6	95	55	42
Predicho	74(3)	66(5)	77(4)	-	49(5)	9(2)	1,5(0,9)	103(5)	55(1)	46(5)
Recuperado	100	98	107	-	94	100	94	108	100	109

Las concentraciones se indican en ng g<sup>-1</sup> y la recuperación en porcentaje. El valor predicho es un promedio de duplicados. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

### 4.1.5 Conclusiones parciales

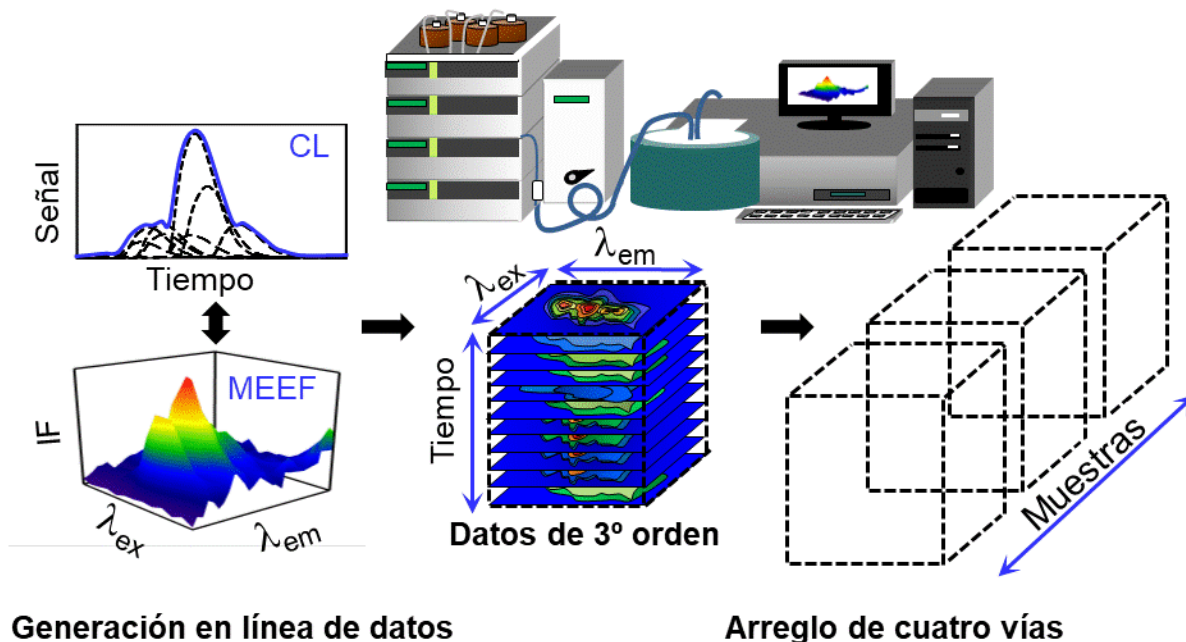
La resolución multivariada de curvas acoplada a cromatografía con detección UV/fluorescente demostró ser una herramienta robusta y capaz de resolver una mezcla compleja de agroquímicos en vegetales.

La detección cromatográfica dual a través de los detectores UV y de fluorescencia permitió determinar un gran número de compuestos, y el hecho de utilizar dos longitudes de onda de excitación en el detector fluorescente mejoró la sensibilidad en dicha detección.

En muestras de validación se obtuvieron LDs entre 0,2-3 ng mL<sup>-1</sup> y 1-4 ng mL<sup>-1</sup> para analitos fluorescentes y no-fluorescentes, respectivamente. Estos límites se calcularon utilizando una expresión rigurosa recomendada IUPAC que no solamente tiene en cuenta los errores de tipo I (falsos positivos) y tipo II (falsos negativos) sino también la propagación de los errores en la pendiente y la ordenada al origen de la curva de calibración a la concentración estimada. Por otro lado, los errores relativos de la predicción que reflejan una combinación de errores sistemáticos y aleatorios, es decir tanto la exactitud como la precisión del método, fueron de 4-14 %.

Los buenos resultados obtenidos en las muestras reales en términos de las cifras de mérito estimadas y de las recuperaciones de los agroquímicos adicionados sugieren que ni los constituyentes naturales ni otros compuestos foráneos que pueden estar posiblemente presentes en los vegetales estudiados produjeron interferencia en el análisis.

## 4.2 Generación en línea de datos de tercer orden/cuatro vías CL-MEEFs. Aplicación a la cuantificación de hidrocarburos policíclicos aromáticos



Continuando con el estudio de datos de origen cromatográfico, en el trabajo presente se obtuvieron por primera vez datos de tercer orden CL-MEEF medidos en línea. El procesamiento de estos datos con herramientas quimiométricas permitió la cuantificación simultánea de ocho HPAs de alto riesgo: FLT, PIR, BaA, CRI, BbF, BkF, BaP y DBA.

La estrategia experimental para obtener este tipo de datos consistió en reducir la velocidad lineal de flujo de la fase móvil aumentando el diámetro del tubo que conecta la columna al detector fluorescente. De este modo, las MEEFs se registraron correctamente durante el experimento cromatográfico, sin implicar un tiempo largo de análisis total. Dado que los datos generados fueron cuadrilineales, pudieron procesarse con el algoritmo PARAFAC de cuatro vías.

La ventaja de segundo orden, que es una propiedad intrínseca de los datos de al

menos segundo orden, permitió la cuantificación de los analitos en presencia de potenciales interferentes, y se logró la resolución de un sistema con alto grado de colinealidad en virtud a la ventaja de tercer orden.

Además de proporcionar estos beneficios, la calibración de tercer orden mejoró significativamente la selectividad y la sensibilidad del método con valores de LDs a niveles de sub-partes por billón.

El empleo de un simple tratamiento de extracción en fase sólida con membrana de C18 permitió la determinación de concentraciones aún menores en muestras de aguas naturales con excelente recuperaciones.

#### **4.2.1 Datos de tercer orden CL-MEEFs obtenidos en línea**

PARAFAC de cuatro vías es un algoritmo que se destaca por sus ventajas tales como: (1) la resolución es única, (2) en general no requiere restricciones<sup>56</sup> y (3) la sensibilidad es máxima.<sup>82</sup> Por lo tanto, con el propósito de procesar los datos de tercer orden con este modelo y aprovechar las ventajas que ofrece, los experimentos se orientaron en el sentido de generar datos cuadrilineales, que es un requisito indispensable de PARAFAC de cuatro vías.

Es importante considerar dos cuestiones fundamentales al modelar con PARAFAC multivía cuando se trabaja con datos cromatográficos, como en nuestro caso. Una de ellas es la posible falta de reproducibilidad en los tiempos de elución entre sucesivos experimentos cromatográficos. Esta limitación tiene lugar cuando se utilizan algoritmos multilineales, debido al requerimiento de tri o cuadrilinealidad de los datos de segundo y tercer orden respectivamente.<sup>46</sup> Sin embargo en nuestro sistema, el análisis de replicados no muestra cambios significativos en los tiempos de elución entre diferentes experimentos.



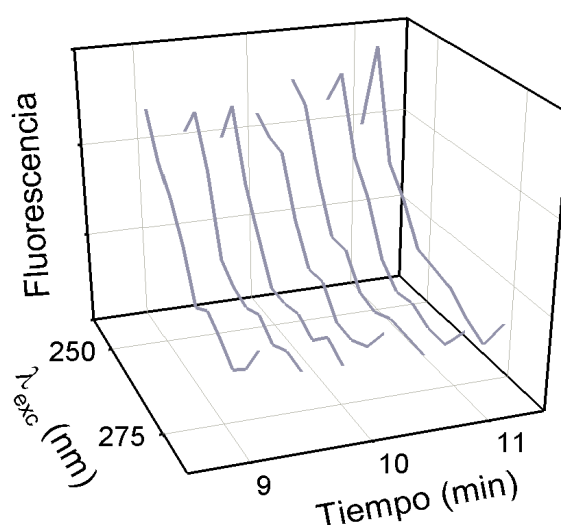
Otra cuestión que se presenta en los datos cromatográficos multivía es la adquisición de los espectros de una muestra en movimiento, lo que produciría una variación en la concentración del analito a medida que se registran los perfiles espectrales. Esto podría, en principio, llevar a una pérdida de multilinealidad. Para el caso de datos de segundo orden CL-DFL se conserva la linealidad debido a que con un espectrofluorómetro de barrido rápido los espectros de emisión se adquieren en tiempos muy cortos y cada espectro de emisión se registra en un tiempo menor al ancho del pico.<sup>83</sup> Sin embargo, para datos de tercer orden CL-MEEF no es posible adquirir matrices en tiempos extremadamente cortos, incluso con modernos equipos de barrido rápido. En consecuencia, en el tiempo requerido para medir una MEEF completa se generan significativas variaciones en la concentración del analito en función de la longitud de onda de excitación. Como resultado, el espectro de excitación del analito se deforma a medida que se adquiere a los distintos tiempos, y esta dependencia entre los perfiles de excitación y tiempo conduce a una pérdida significativa de la cuadrilinealidad.<sup>46</sup>

Las MEEFs se pueden medir en un tiempo apropiado durante una elución cromatográfica disminuyendo la VLF de la fase móvil, sin aumentar significativamente el tiempo total de análisis. La VLF se relaciona con el flujo volumétrico (FV) y el área de la sección transversal del tubo conector (A) a través de la siguiente ecuación:

$$FV = VLF \times A \quad (10)$$

Es evidente que la VLF puede disminuirse a FV constante aumentando el diámetro del tubo por el que fluye la fase móvil. Por esta razón, se decidió utilizar un tubo conector de PTFE de 1,60 mm de diámetro interno para conectar la columna con el

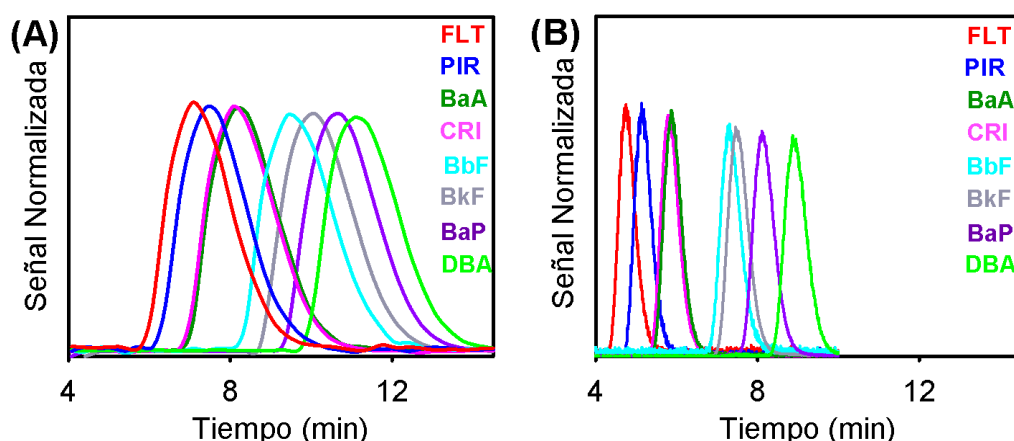
detector fluorescente, en vez de la usual tubería cromatográfica de 0,76 mm de diámetro interno utilizada en las demás conexiones del equipo. Se ensayaron tres longitudes diferentes para el tubo conector (25, 50 y 100 cm), así como diversos valores de FV en el rango de 0,4 a 0,7 mL min<sup>-1</sup>. Se corroboró que una longitud del tubo de 50 cm y un FV de 0,4 mL min<sup>-1</sup> produjeron las mejores señales, permitiendo una adquisición efectiva de MEEFs en un tiempo aproximado de 17 minutos. En estas condiciones experimentales, se verificó la ausencia de dependencia mutua entre los perfiles de excitación y de tiempo, presente en un experimento cromatográfico desarrollado a VLF y FV constantes. A modo de ejemplo, en la Figura 15 se muestran los perfiles de excitación de BkF a diferentes tiempos de elución y en las condiciones experimentales seleccionadas. En dicha figura se aprecia que los perfiles no se modifican significativamente durante su adquisición, conservándose de esta manera la cuadrilinealidad del sistema. Como se demostrará más adelante, PARAFAC de cuatro vías se pudo aplicar exitosamente en el procesamiento de los datos, hecho que indirectamente demuestra la cuadrilinealidad del sistema.



**Figura 15.** Matriz tiempo de elución-longitud de onda de excitación de BkF a su longitud de onda máxima de emisión.

### 4.2.2 Sistema de HPAs en estudio

En la Figura 16A se muestran los cromatogramas obtenidos para cada analito en las condiciones cromatográficas previamente descritas. A su vez, en la Figura 16B se presentan los cromatogramas obtenidos en similares condiciones experimentales pero sin el uso del tubo conector de mayor sección transversal. Al comparar ambas figuras se concluye que el empleo de dicho tubo conector produce un aumento en el ancho de los picos que nos permite medir las MEEFs sin pérdida de cuadrilinealidad, y sin alargar significativamente el tiempo total de análisis. A pesar de que en ninguno de los casos se logra una resolución completa de los picos, esto no representa una limitación para la resolución matemática mediante el uso de calibración multivía.

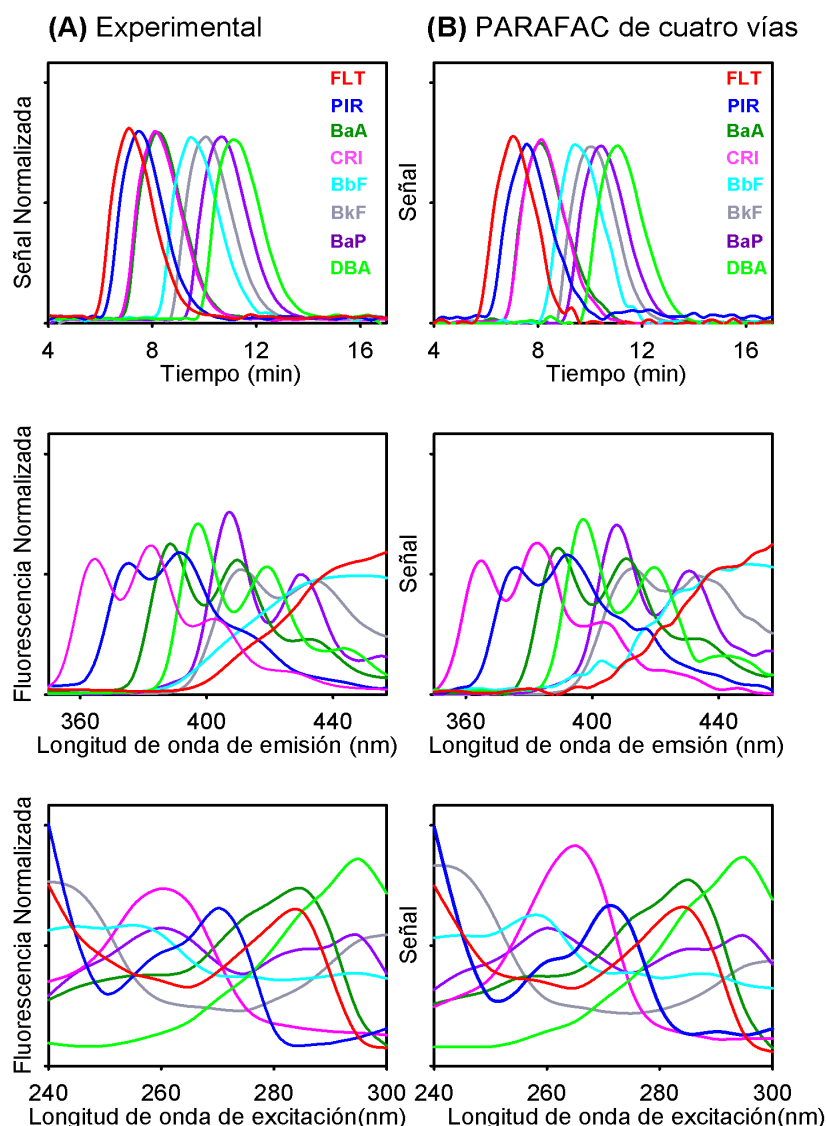


**Figura 16.** Perfiles cromatográficos de los HPAs estudiados en las condiciones experimentalmente evaluadas (A), y en las condiciones usuales con tubos conectores de igual diámetro en todo el equipo (B).

En la Figura 17 se muestran los cromatogramas obtenidos para una muestra de validación en nuestras condiciones de trabajo junto a los espectros de emisión y excitación de cada analito y los perfiles temporales y espectrales predichos por PARAFAC de cuatro vías.

La complejidad del sistema en estudio se hace evidente en el alto grado de solapamiento de los analitos en los diferentes perfiles: la coelución total entre BaA y

CRI, la similitud entre los perfiles de emisión del par FLT-BbF y del par BaP-BkF y también entre los perfiles de excitación de FLT y BaA.



**Figura 17:** (A) Cromatograma y perfiles espectrales experimentales de los HPAs estudiados en una muestra de validación: FLT (rojo), PIR (azul), BaA (verde), CRI (rosa), BbF (turquesa), BkF (gris), BaP (violeta), DBA (verde claro). (B) Cromatograma y perfiles espectrales recuperados por PARAFAC de cuatro vías para la misma muestra.

En sistemas complejos que presentan alta colinealidad, como en este caso, una calibración de segundo orden no ofrece la posibilidad de una buena resolución. Sin embargo, la calibración de tercer orden puede solucionar este inconveniente, como se demostrará a continuación.

### 4.2.3 Teorema de Kruskal y su generalización

Este teorema se refiere a la unicidad de la descomposición trilineal y expresa que si se cumple la siguiente ecuación, la descomposición trilineal será única:

$$k_a + k_b + k_c \geq 2F + 2 \quad (11)$$

Donde  $k_a$ ,  $k_b$  y  $k_c$  son los rangos de Kruskal de las tres matrices de PARAFAC de tres vías (*loadings* y *score*), y  $F$  es el número de componentes.

En PARAFAC el rango de Kruskal es igual al rango de la matriz cuando las columnas son linealmente independientes ( $k = F$ ). Cuando existe colinealidad el rango de Kruskal  $k$  es igual a 1. Es decir, si existe colinealidad en uno de los modos la desigualdad de la ecuación (12) no se cumple y por lo tanto PARAFAC no resuelve el sistema.

Sidiropoulos y Bro<sup>84</sup> generalizaron el teorema de Kruskal al caso de una descomposición de un arreglo multivía.

La ecuación generalizada de Sidiropoulos y Bro para tercer orden u órdenes mayores es:

$$\sum_{\delta=1}^N k(\delta) \geq 2F + (N - 1) \quad (12)$$

donde  $\delta$  toma valores de 1 a  $N$  ( $N$  = número de modos).

Por ejemplo, para un sistema de tercer orden con dos componentes ( $F = 2$ ) y sin colinealidad, la ecuación toma la siguiente forma:

$$F + F + F + F \geq 2F + 3 \quad (13)$$

$$8 \geq 7 \quad (14)$$

y la descomposición del arreglo es única.

En el caso de que exista colinealidad en un modo, para el mismo sistema de dos

componenetes:

$$F + F + F + F \geq 2F + 3 \quad (13)$$

$$7 \geq 7 \quad (15)$$

y la descomposición sigue siendo única, aún en presencia de colinealidad.

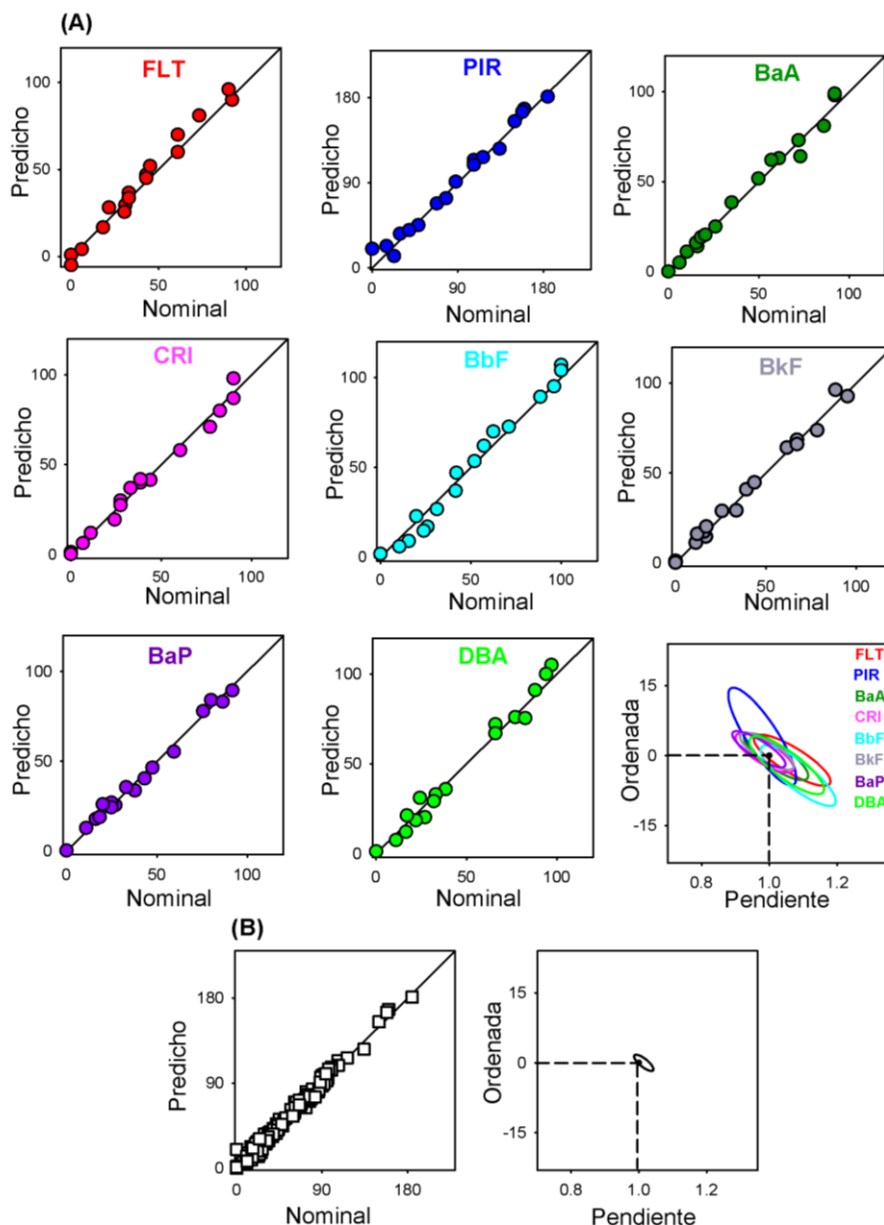
La descomposición única en esta situación, y que se alcanza con calibración de tercer orden cuatro vías, representa la ventaja de tercer orden.

## 4.2.4 Muestras de validación

El método se evaluó a través del procesamiento de muestras de validación y el correspondiente cálculo de recuperaciones y cifras de mérito.

Se requirieron diez componentes de PARAFAC para describir adecuadamente la variabilidad del arreglo de cuatro vías en las muestras de validación. Ocho de estos componentes corresponderían a los analitos de nuestro sistema y los dos restantes a señales del blanco. En la Figura 17 (página 95) se muestran los perfiles modelados por PARAFAC de cuatro vías y los obtenidos experimentalmente. La semejanza en los perfiles recuperados por PARAFAC de cuatro vías se evaluó siguiendo el criterio de similaridad, que implica la comparación a través del coeficiente de similaridad ( $r$ ) de los perfiles de referencia y los predichos (Figura 17A).<sup>85</sup> Los valores de  $r$  calculados para los perfiles de emisión de FLT, PIR, BaA, CRI, BbF, BaP y DBA fueron 0,9979; 0,9989; 0,9994; 0,9950; 0,9832; 0,9980 y 0,9990, respectivamente, mientras que los valores para los perfiles de excitación fueron 0,9993; 0,9974; 0,9406; 0,9992; 0,9987; 0,9953; 0,9997 y 0,9998, respectivamente. Estos valores corroboran la excelente calidad de los resultados obtenidos a partir de PARAFAC de cuatro vías.

En la Figura 18 se muestran las buenas predicciones del algoritmo para cada analito (Figura 18A), así como para el conjunto de HPAs (Figura 18B) en las muestras de validación.



**Figura 18.** (A) Gráficos individuales de concentraciones predichas en función de los valores nominales de cada HPA en muestras de validación y las correspondientes regiones elípticas de confianza conjunta para las pendientes e intersecciones de las regresiones de predicción. (B) Gráfico de concentraciones predichas en función de los valores nominales para todos los HPAs evaluados y la correspondiente elipse global incluyendo todas las predicciones. Los círculos negros marcan el punto teórico (ordenada al origen = 0, pendiente = 1).

La evaluación estadística de los resultados se realizó con el test de la elipse EJCR, que consiste en graficar la región al 95% de confianza, entre la pendiente y la

ordenada al origen obtenidas en las regresiones de las concentraciones nominales vs las predichas (Figura 18A y Figura 18B).<sup>81</sup> El hecho que las elipses incluyeron al valor teóricamente esperado de pendiente igual a 1 y ordenada al origen igual a 0 sugiere exactitud en las determinaciones.

Los resultados estadísticos para las muestras de validación se completaron con los parámetros expuestos en la Tabla 13. Los límites de detección se estimaron usando las expresiones recomendadas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), que tiene en cuenta los errores tipo I (falsos detectables) y tipo II (falsos no detectables), que se encuentra expresada en la página 81.<sup>82</sup>

**Tabla 13:** Resultados estadísticos para el conjunto de HPAs en muestras de validación y muestras de prueba con el agregado de interferentes.

	FLT	PIR	BaA	CRI	BbF	BkF	BaP	DBA
Muestras de validación								
$\gamma$	1,6	1,2	4,2	3,6	2,1	9,2	6,5	3,3
Sel	0,90	0,75	0,78	0,77	0,55	0,49	0,56	0,82
LD	2,1	2,9	0,8	1,0	1,6	0,4	0,5	1
ECMP	6,4	8,9	2,5	2,9	4,9	1,2	1,6	3,1
RMSEP	4	7	3	3	5	3	2	4
ERP	8	7	6	6	10	6	4	8
Muestras de prueba con interferentes								
$\gamma$	1,1	0,77	3,9	2,4	2,2	10	5,6	3,1
Sel	0,65	0,49	0,72	0,51	0,58	0,50	0,56	0,79
LD	3,0	4,4	0,9	1,5	1,6	0,3	0,6	1,1
LQ	9,2	13	2,7	4,4	4,7	1,0	1,9	3,4
ECMP	6	11	4	5	6	4	4	7
ERP	12	11	8	10	12	8	8	14

$\gamma$ , Sensibilidad analítica en  $\text{ng}^{-1}\text{mL}$ ; Sel, selectividad; LD límite de detección en  $\text{ng mL}^{-1}$ ; LQ límite de cuantificación en  $\text{ng mL}^{-1}$  calculado de acuerdo a Ref. [82]; ECMP error cuadrático medio de la predicción en  $\text{ng mL}^{-1}$  y ERP error relativo de la predicción.

La sensibilidad del método está definida por la ecuación (16):<sup>82</sup>

$$\text{SEN} = \left\{ \mathbf{g}^T \left[ \mathbf{Z}_{\text{exp}}^T (\mathbf{I} - \mathbf{Z}_{\text{unx}} \mathbf{Z}_{\text{unx}}^+) \mathbf{Z}_{\text{exp}} \right]^{-1} \mathbf{g} \right\}^{-1/2} \quad (16)$$



En esta ecuación,  $\mathbf{I}$  representa la matriz unidad,  $\mathbf{g}$  es un vector columna de tamaño  $N_{\text{cal}} \times 1$  ( $N_{\text{cal}}$  es el número de analitos) con ceros excepto un uno en la posición del analito. La matriz  $\mathbf{Z}_{\text{exp}}$  está dada por la siguiente ecuación:

$$\mathbf{Z}_{\text{exp}} = m\mathbf{D}_{\text{exp}} \odot \mathbf{C}_{\text{exp}} \odot \mathbf{B}_{\text{exp}} \quad (17)$$

donde  $m$  representa la pendiente de la curva de calibración pseudounivariada para el analito,  $\mathbf{D}_{\text{exp}}$ ,  $\mathbf{C}_{\text{exp}}$  y  $\mathbf{B}_{\text{exp}}$  son las matrices de los perfiles en los tres modos para todos los analitos, y " $\odot$ " indica el producto con el operador Khatri-Rao. Por otro lado, la matriz  $\mathbf{Z}_{\text{unx}}$  proviene de la siguiente ecuación:

$$\mathbf{Z}_{\text{unx}} = [\mathbf{d}_1 \otimes \mathbf{c}_1 \otimes \mathbf{I}_b | \mathbf{d}_1 \otimes \mathbf{I}_c \otimes \mathbf{b}_1 | \mathbf{I}_d \otimes \mathbf{c}_1 \otimes \mathbf{b}_1 | \mathbf{d}_2 \otimes \mathbf{c}_2 \otimes \mathbf{I}_b | \mathbf{d}_2 \otimes \mathbf{I}_c \otimes \mathbf{b}_2 | \mathbf{I}_d \otimes \mathbf{c}_2 \otimes \mathbf{b}_2 | \dots] \quad (18)$$

donde  $\mathbf{b}_1, \mathbf{b}_2, \dots, \mathbf{c}_1, \mathbf{c}_2, \dots, \mathbf{d}_1, \mathbf{d}_2, \dots$  son las columnas de las matrices  $\mathbf{B}$ ,  $\mathbf{C}$ ,  $\mathbf{D}$  para los constituyentes inesperados (interferentes),  $\mathbf{I}_b$ ,  $\mathbf{I}_c$  y  $\mathbf{I}_d$  son matrices unitarias dimensionadas apropiadamente, y " $\otimes$ " es el producto de Kronecker. Los números 1, 2, ... corresponden al número total de constituyentes inesperados.

El límite de cuantificación (LQ) se define como:

$$\text{LQ} = 3 \times \text{LD} \quad (19)$$

El análisis de un sistema similar de HPAs modelado mediante calibración de segundo orden para datos cromatográficos con detección fluorescente, realizado anteriormente por nuestro grupo de trabajo, arrojó valores de límites de detección de 20, 26, 17, 10, 4, 1, 2 y 2 ng mL<sup>-1</sup> para FLT, PIR, BaA, CRI, BbF, BkF, BaP y DBA respectivamente.<sup>83</sup> La comparación de estos valores con los aquí obtenidos (LDs entre 0,4 y 2,9 ng mL<sup>-1</sup>) demuestra la influencia positiva de la calibración de tercer orden/cuatro vías en la sensibilidad del método. Los beneficios de este tipo de calibración se corroboran también a través de los valores de selectividades, todas

mayores a 0,49, y altos valores de sensibilidades analíticas.

La selectividad viene dada por la Ecuación (20).<sup>82</sup>

$$SEL = SEN/m \quad (20)$$

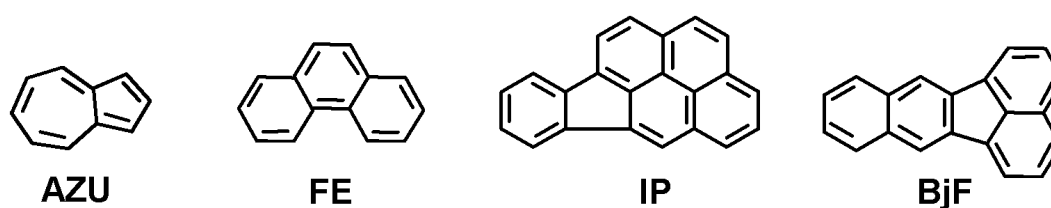
Se ha propuesto a la sensibilidad analítica ( $\gamma$ ) como un mejor indicador de comparación de métodos y se calcula mediante una relación entre la sensibilidad y el ruido instrumental:<sup>82</sup>

$$\gamma = SEN/\sigma_x \quad (21)$$

Los errores cuadráticos medios (ECMs) y los errores relativos de la predicción (ERPs) calculados a partir de la concentración media de la calibración de cada analito (menor a 7 ng mL<sup>-1</sup> y 10 %, respectivamente) son aceptables considerando la complejidad del sistema evaluado.

#### Pruebas con potenciales interferentes

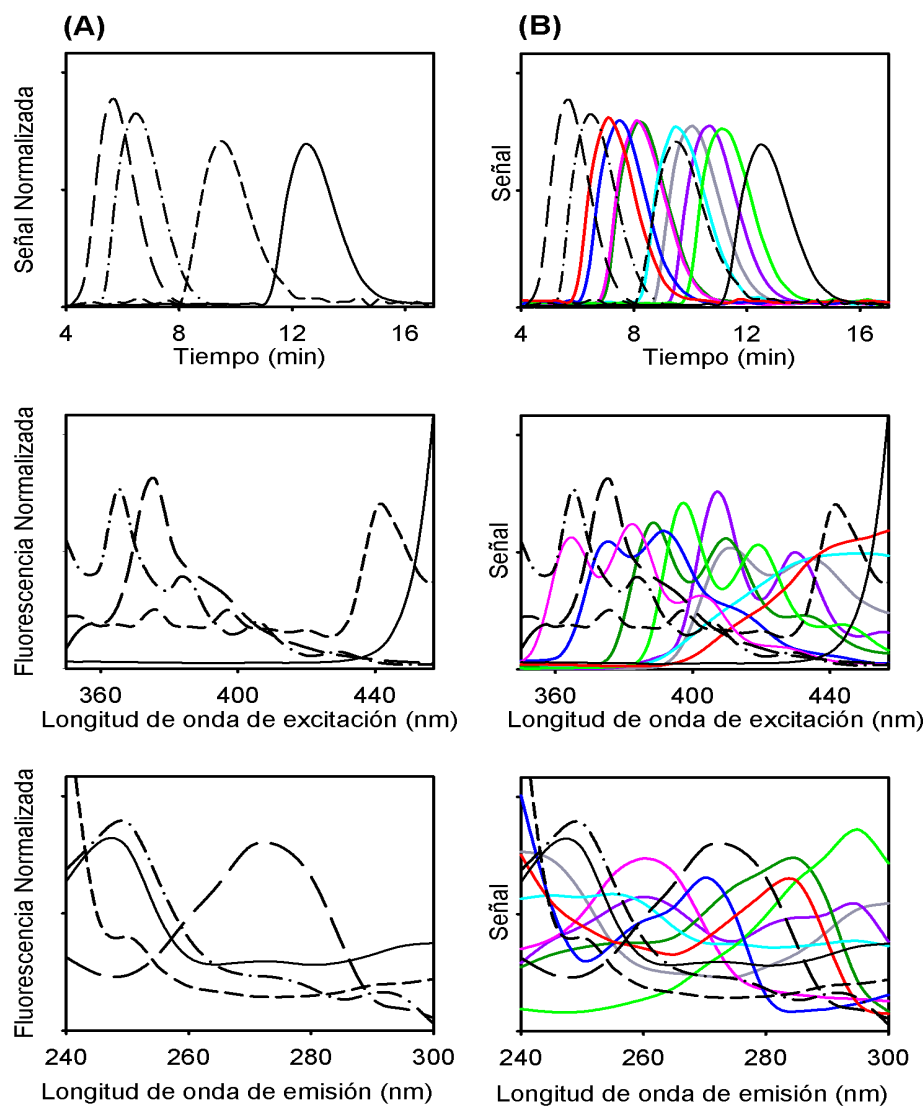
El alcance del método se evaluó realizando las determinaciones en presencia de otros HPAs (AZU, FE, IP y BjF, Figura 19), ya que presentan coelución y superposición espectral con los analitos calibrados.



**Figura 19.** Estructuras químicas del conjunto de HPAs contaminantes interferentes.

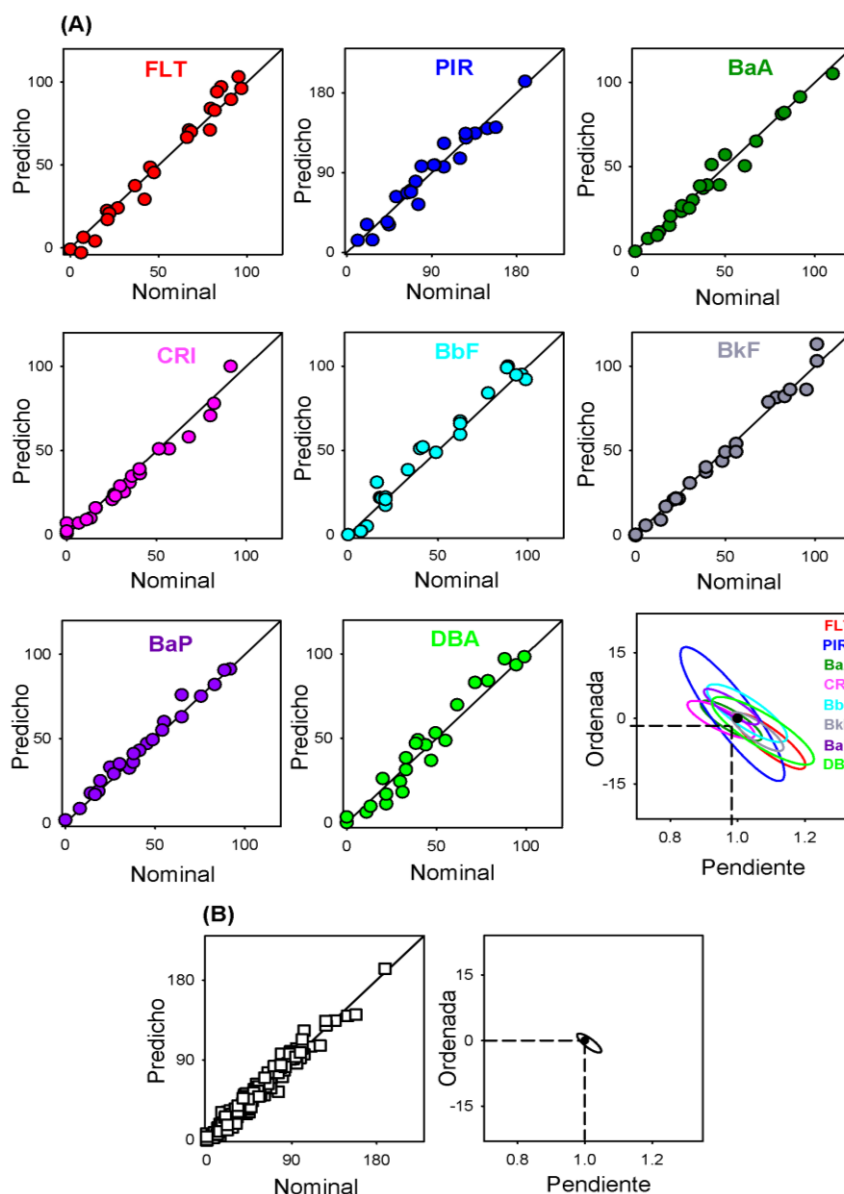
Los perfiles cromatográficos espectrales de estos potenciales interferentes se muestran en la Figura 20A y su importante solapamiento con los HPAs estudiados en la Figura 20B. Además, se detecta una situación de colinealidad entre las bandas cromatográficas de BbF (analito) y BjF (componente no calibrado), similar a la ya

indicada para los analitos CRI y BaA. Como se discutió previamente en relación a la ventaja de tercer orden, este hecho no representa un problema serio cuando se aplica calibración de tercer orden, siempre que los perfiles espectrales sean diferentes.



**Figura 20.** (A) Cromatogramas y perfiles espectrales experimentales de los potenciales hidrocarburos interferentes (A): AZU (líneas punteadas largas); FE (líneas continuas); IP (líneas y puntos) y BjF (líneas punteadas cortas). (B) Cromatogramas, espectros de emisión y excitación de los potenciales interferentes superpuestos al sistema de HPAs en estudio.

La Figura 21 muestra las buenas predicciones obtenidas para cada analito (Figura 21A) y para el conjunto de HPAs (Figura 21B) en muestras con potenciales interferentes. Si bien los valores de BbF y DBA muestran una ligera dispersión con respecto al ajuste ideal, sus elipses implican predicciones exactas y la habilidad de PARAFAC de cuatro vías para resolver sistemas altamente superpuestos.



**Figura 21.** (A) Gráficos individuales de concentraciones predichas en función de los valores nominales para cada HPA en muestras con potenciales interferentes. (B) Gráfico de concentraciones predichas en función de los valores nominales para todos los HPAs evaluados y la correspondiente elipse global incluyendo todas las predicciones. Los círculos negros marcan el punto teórico (ordenada al origen = 0, pendiente = 1).

Esta conclusión se corrobora con los resultados estadísticos de la Tabla 13.

Mientras que la presencia de compuestos no calibrados produce un incremento en los valores de ERP, los LDs no muestran estar considerablemente afectados.

## 4.2.5 Muestras reales

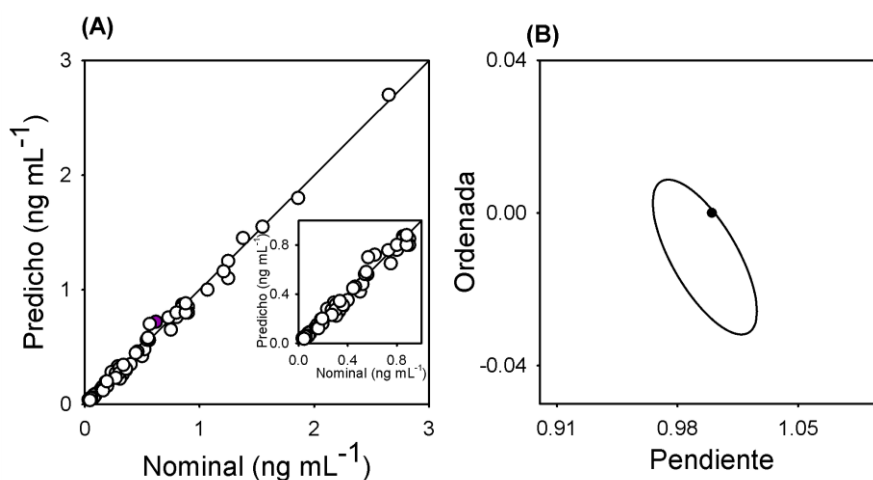
Con el propósito de evaluar el método propuesto en matrices reales, se aplicó a muestras de agua de diferentes orígenes geográficos. Una muestra correspondió a

agua subterránea de la zona rural de la Pampa y las restantes se colectaron en arroyos del sur de Santa Fe, en regiones de alta actividad rural e industrial.

Debido a que ensayos previos demostraron que las aguas analizadas no contenían HPAs, las muestras se enriquecieron con los analitos para evaluar su recuperación.

En aguas superficiales se pueden encontrar niveles de HPAs que varían desde partes por trillón a partes por billón en áreas contaminadas.<sup>86,87</sup> Por lo tanto, se cubrió un amplio rango de concentraciones utilizando un simple tratamiento de preconcentración. La US-EPA admite para aguas de consumo los siguientes valores máximos de contaminantes (MNCs): 0,2 ng mL<sup>-1</sup> para BaP, BbF y BkF; 0,1 ng mL<sup>-1</sup> para BaA y 0,3 ng mL<sup>-1</sup> para DBA.<sup>88</sup>

La Figura 22A expone gráficamente las concentraciones de los HPAs recuperadas por PARAFAC de cuatro vías en muestras reales (Tabla 14). La correspondiente elipse (Figura 22B) demuestra que no hay diferencias significativas entre las concentraciones nominales y predichas, sugiriendo que los componentes no calibrados presentes en la matriz no producen una interferencia significativa en nuestro análisis.



**Figura 22.** (A) Gráfico de concentraciones predichas por PARAFAC de cuatro vías en función de los valores nominales de los HPAs en muestras de aguas. (B) Gráfico de la región elíptica de confianza conjunta al 95% de confianza. El círculo negro marca el punto teórico (ordenada al origen = 0, pendiente = 1).

**Tabla 14:** Recuperaciones de HPAs en muestras de aguas enriquecidas.

	FLT	PIR	BaA	CRI	BbF	BkF	BaP	DBA
<b>Agua I</b>								
Nominal	0,055	0,044	0,054	0,055	0,052	0,056	0,054	0,045
Predicho	0,052(1)	0,045(5)	0,049(1)	0,056(2)	0,053(2)	0,058(1)	0,054(1)	0,035(2)
Recuperado	95	102	91	102	102	104	100	78
<b>Agua II</b>								
Nominal	0,183	0,880	0,400	0,160	0,360	0,300	0,140	0,250
Predicho	0,195(9)	0,80(5)	0,35(2)	0,12(1)	0,30(3)	0,26(1)	0,13(1)	0,26(2)
Recuperado	106	91	88	75	83	87	93	104
<b>Agua III</b>								
Nominal	0,091	0,165	0,080	0,090	0,052	0,080	0,080	0,055
Predicho	0,075(7)	0,145(7)	0,060(5)	0,089(2)	0,054(2)	0,082(1)	0,059(8)	0,042(2)
Recuperado	82	88	75	99	104	103	74	76
<b>Agua IV</b>								
Nominal	0,303	0,445	0,306	0,300	0,360	0,336	0,271	0,567
Predicho	0,315(2)	0,447(2)	0,223(6)	0,270(3)	0,31(3)	0,343(9)	0,23(2)	0,70(2)
Recuperado	104	100	73	90	86	102	85	123
<b>Agua V</b>								
Nominal	0,153	0,033	0,150	0,180	0,180	0,195	0,160	0,193
Predicho	0,15(2)	0,04(1)	0,12(3)	0,16(1)	0,16(1)	0,16(1)	0,12(1)	0,200(3)
Recuperado	98	131	80	89	89	82	75	104
<b>Agua VI</b>								
Nominal	0,620	0,800	0,500	0,520	0,460	0,560	0,540	0,540
Predicho	0,72(5)	0,80(1)	0,42(4)	0,48(4)	0,46(9)	0,56(3)	0,51(3)	0,563(1)
Recuperado	116	100	84	92	100	100	94	104
<b>Agua VII</b>								
Nominal	0,552	0,288	0,250	0,330	0,260	0,233	0,300	0,270
Predicho	0,58(9)	0,33(2)	0,23(3)	0,26(1)	0,27(3)	0,28(1)	0,26(3)	0,27(1)
Recuperado	105	114	92	79	104	120	87	100
<b>Agua VIII</b>								
Nominal	1,07	1,86	1,25	1,38	0,88	1,55	1,25	1,21
Predicho	1,00(1)	1,80(1)	1,25 (9)	1,45(6)	0,88(1)	1,55(2)	1,10(9)	1,16(5)
Recuperado	93	97	100	105	100	100	88	96
<b>Agua IX</b>								
Nominal	0,850	2,65	0,750	0,900	0,900	0,800	0,850	0,730
Predicho	0,87(6)	2,70(8)	0,65(3)	0,850(7)	0,80(8)	0,76(3)	0,85(8)	0,757(3)
Recuperado	102	102	87	94	89	95	100	104

Aguas: I y II, Arroyo Salbat (Santa Fe, Argentina); III y IV, arroyo Ludueña (Santa Fe, Argentina); V y VI, arroyo Ibarlucea (Santa Fe, Argentina); VII, agua subterránea de Santa Rosa (La Pampa, Argentina); VIII y IX, arroyo Andino (Santa Fe, Argentina). Las concentraciones están expresadas en ng mL<sup>-1</sup> y las recuperaciones en porcentajes. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar de duplicados y corresponde a la última cifra significativa.

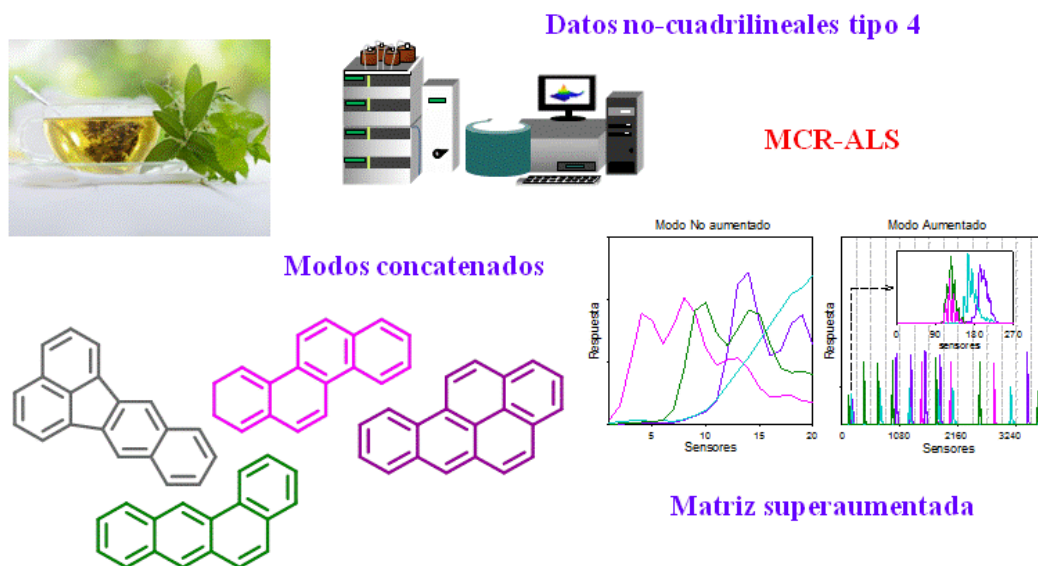
## 4.2.6 Conclusiones parciales

En esta parte del trabajo doctoral se propuso una nueva estrategia para obtener de manera práctica y sencilla datos de tercer orden tiempo de elución-matrices de excitación-matrices de emisión de fluorescencia.

El recurso utilizado se basó en la adquisición de MEEFs en forma simultánea a la medida cromatográfica, disminuyendo así el tiempo experimental, la generación de residuos y empleando un equipo de baja complejidad con una pequeña modificación.

Por otro lado, la ventaja de tercer orden, evidenciada a través de la correcta resolución de un sistema con alto grado colinealidad entre los analitos entre si y constituyentes no calibrados, se suma a los conocidos beneficios que produce el aumento del número de modos en la calibración multivía.

### 4.3 Aplicación del modelo MCR-ALS a datos de tercer orden/cuatro vías CL-MEEFs no cuadrilineales generados en línea. Cuantificación de HPAs en muestras de té



En este trabajo se resolvió quimiométricamente, por primera vez, un sistema de tercer orden/cuatro vías con modos instrumentales dependientes. Siguiendo con los lineamientos del trabajo anterior, se determinaron simultáneamente cuatro indicadores de la presencia de HPAs en muestras de alimentos: BaP, BaA, CRI y BbF. Se utilizó un equipo CLAE acoplado a un espectrofluorómetro de barrido rápido y se obtuvieron datos no-cuadrilineales tipo 4 adquiridos en línea, registrando matrices de excitación-emisión fluorescente (MEEFs) en función del tiempo de elución.

El empleo de datos de tercer orden no solo da lugar a métodos más sensibles y selectivos, sino que también reduce notablemente el tiempo de trabajo experimental en comparación con otras estrategias informadas anteriormente para la adquisición de datos CL-MEEF. El algoritmo MCR-ALS permitió procesar los datos sin inconvenientes, concatenando dos modos instrumentales mutuamente dependientes



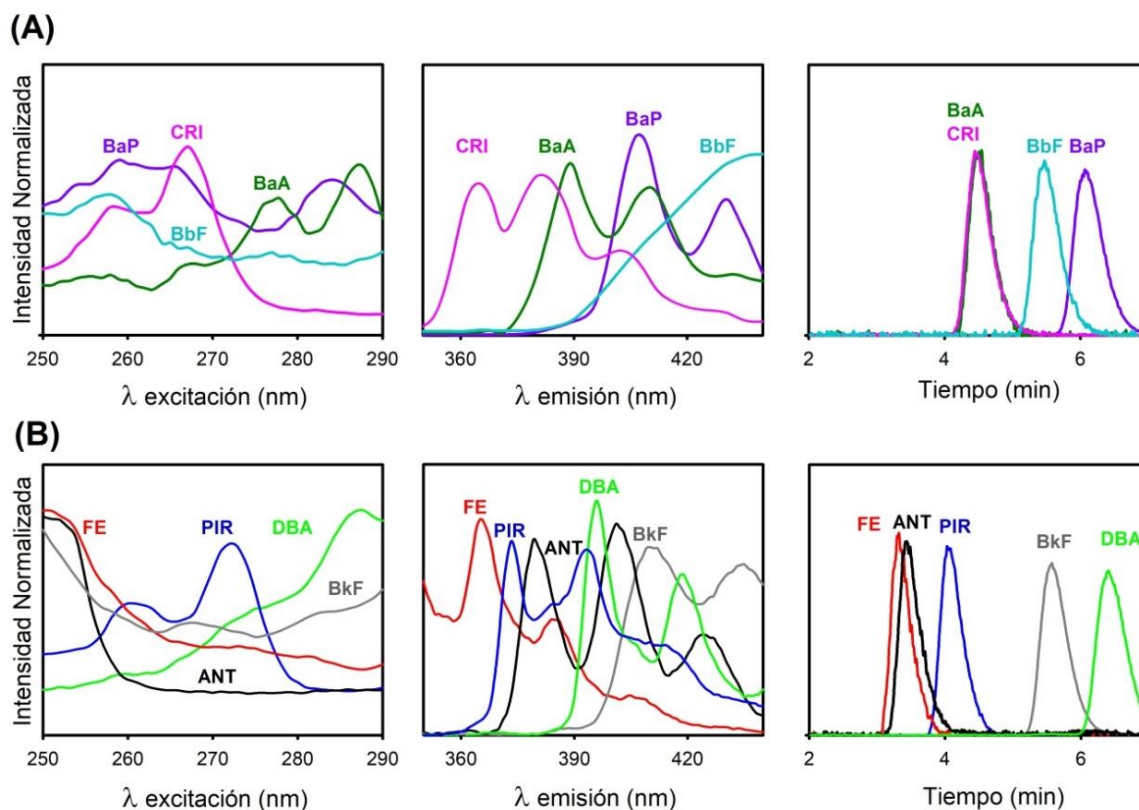
(modo excitación-modo temporal).

El método desarrollado se aplicó a la cuantificación de estos indicadores en diversas muestras de té y se validó utilizando como método de referencia cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. De esta forma, se logró medir concentraciones de los HPAs estudiados a niveles aún menores a los establecidos por la legislación para este tipo de muestras.

#### **4.3.1 Consideraciones generales del sistema estudiado**

En la Figura 23A se aprecia la superposición de los espectros de excitación y emisión de BaA, CRI, BbF y BaP así como sus comportamientos cromatográficos en las condiciones isocráticas seleccionadas. Este sistema podría potencialmente resolverse aplicando calibración multivariada, cuya utilidad se haría aún más evidente al investigar muestras reales conteniendo constituyentes inesperados que podrían solapar sus señales con las de los analitos en estudio.

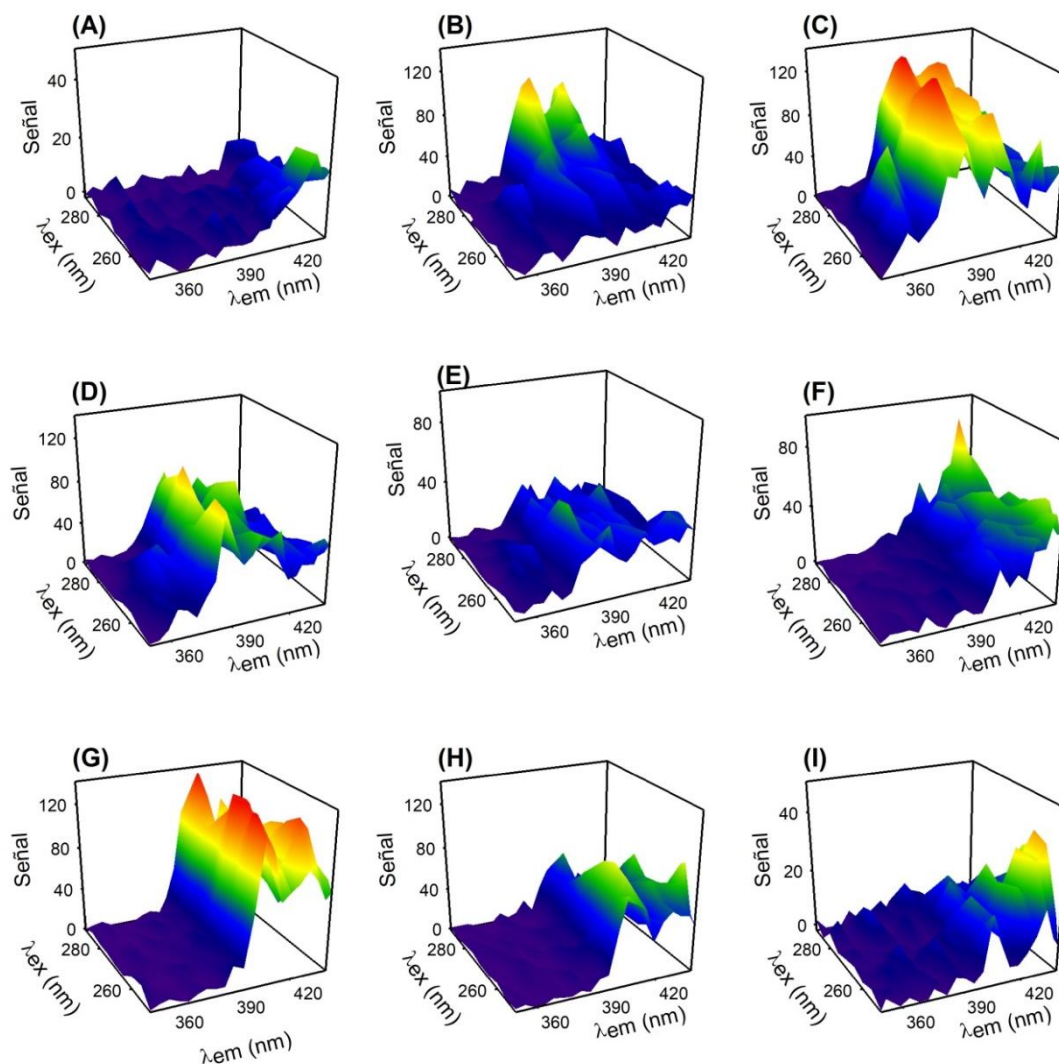
Como se indicó anteriormente, la calibración de tercer orden/cuatro vías usando medidas cromatográficas con detección fluorescente ofrece varias ventajas en relación a las calibraciones de menor orden: además de permitir la determinación de los analitos en presencia de compuestos no calibrados (ventaja de segundo orden),<sup>43</sup> mejora significativamente la selectividad y sensibilidad del método.<sup>51,83</sup>



**Figura 23.** Perfiles espectrales y cromatogramas experimentales de los HPAs en estudio (A) y de potenciales HPAs interferentes (B).

En la Figura 24 se muestran las MEEFs del sistema estudiado, registradas a distintos tiempos de elución cromatográficos.

Entre las tres modalidades propuestas para adquirir datos CL-MEEF<sup>51</sup> (ver Introducción, página 36) la más atractiva es la que se realiza en tiempo real, principalmente porque reduce el tiempo total de análisis, el consumo de reactivos, la complejidad y costo del equipamiento, y puede ser una alternativa conveniente para estudiar analitos inestables o volátiles.



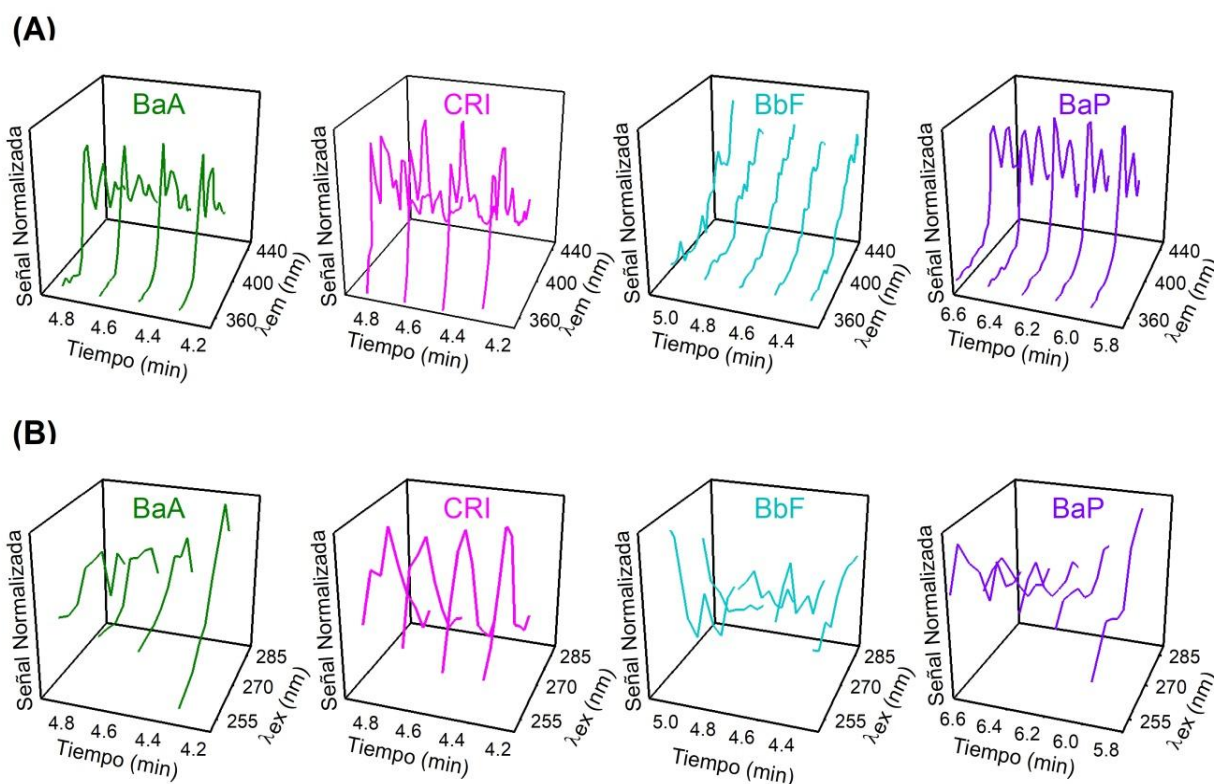
**Figura 24.** MEEFs de una muestra de validación con BaA, CRI, BbF y BaP, cada uno a una concentración aproximada de  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  medidas a los siguientes tiempos (A) 3,08 min, (B) 4,16 min, (C) 4,34 min, (D) 4,52 min, (E) 4,70 min, (F) 5,06 min, (G) 5,78, (H) 6,14 e (I) 6,50 min.

Sin embargo, en un experimento convencional con medidas de datos CL-MEEF a velocidades de flujo lineal y volumétrica constantes, mientras que los espectros de emisión se registran correctamente en un tiempo apreciablemente menor al ancho de base de cada pico cromatográfico, debido al uso de un espectrofluorómetro de barrido rápido,<sup>83,89</sup> el espectro de excitación de cada analito se deforma en función del tiempo de elución (Figura 25). Esto ocurre porque el monocromador de excitación requiere un tiempo adicional para cambiar la longitud de onda de excitación. La dependencia mutua entre los perfiles de excitación y de tiempo

produce una pérdida de cuadrilinealidad de los datos, originando datos no-cuadrilineales tipo 4.<sup>50,51</sup>

Los datos no-cuadrilineales de tipo 4 incluyen subtipos relacionados con el número de modos instrumentales y de muestra mutuamente dependientes.

En nuestro caso, además de verificarse la mutua dependencia entre los tiempos de elución y la longitud de onda de excitación, el tiempo de elución es muestra-dependiente dado que se producen cambios en estos tiempos entre sucesivas inyecciones cromatográficas.



**Figura 25.** Matrices tiempo de elución-longitud de onda de emisión (A) y matrices tiempo de elución-longitud de onda de excitación (B) para BaA, CRI, BbF y BaP a sus correspondientes longitudes de onda máximas de excitación y emisión, respectivamente.

Un recurso posible para procesar este tipo de datos, y que se aplicó en este trabajo por primera vez, consiste en concatenar los dos modos instrumentales mutuamente dependientes, dando origen a un arreglo de tres vías.

La dependencia adicional que existía entre el tiempo de elución y la muestra,

ahora se traslada a una dependencia entre el modo “tiempo de elución-excitación” y la muestra, resultando en datos no-trilineales tipo 1.<sup>59</sup>

En otras palabras, la estrategia quimiométrica consiste en construir una matriz superaumentada concatenando los perfiles de tiempo y de excitación por un lado (modo aumentado) y el modo emisión por el otro, para cada muestra, y luego ubicando las matrices obtenidas en forma adyacente una al lado de la otra. Asumiendo que la matriz superaumentada es bilineal, ésta puede procesarse adecuadamente con MCR-ALS,<sup>46</sup> seleccionando las restricciones apropiadas para conducir el ajuste de mínimos cuadrados a una solución químicamente correcta.

Después de la descomposición matemática de la matriz superaumentada de datos, se construye un gráfico de calibración pseudo-univariada con las concentraciones relativas (*scores*) de los analitos en las muestras de calibración, interpolando el *score* del analito contenido en la muestra incógnita y obteniendo la concentración predicha. Las concentraciones de los analitos se estiman integrando el área de los perfiles desdoblados tiempo de elución-excitación para cada muestra.

### 4.3.2 Modelado con MCR-ALS: muestras de validación

Cada muestra de validación junto a todas las muestras de calibración se utilizaron en la construcción de las matrices de datos superaumentadas para el tratamiento con MCR-ALS. Los componentes del sistema se determinaron a través del análisis por componentes principales,<sup>46</sup> y el valor hallado se correspondió con los cuatro HPAs investigados.

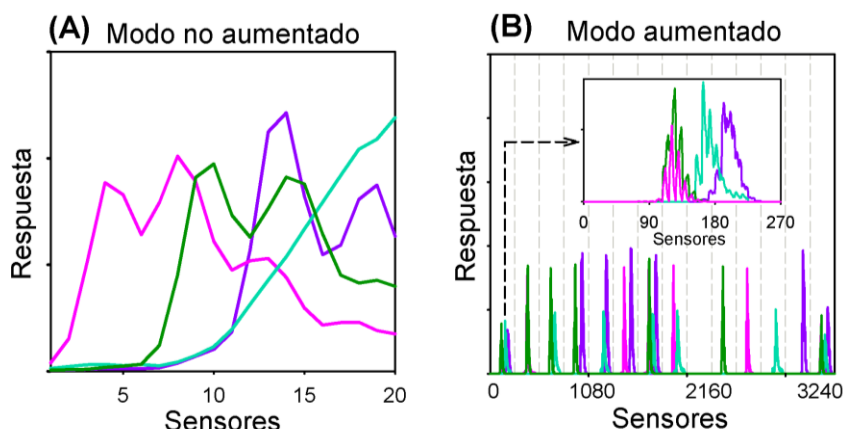
Los perfiles iniciales utilizados para comenzar el ajuste con MCR-ALS se obtuvieron por estimación de las así llamadas variables más puras en el dominio espectral de emisión. Se aplicaron restricciones de no-negatividad en los modos

aumentado y no-aumentado, correlación de áreas y correspondencia entre componentes y muestras.<sup>59,90</sup>

La restricción de unimodalidad se aplicó de la siguiente manera: en la dirección aumentada (compuesta por los modos tiempo y longitud de onda de excitación), el modo temporal se separó del espectral y se aplicó unimodalidad al primero. Luego, ambos modos se concatenaron nuevamente.

Después de la convergencia del ciclo de cuadrados mínimos alternantes, los HPAs se identificaron a partir de sus perfiles de emisión y se llevó a cabo la cuantificación a través de cada curva de calibración pseudo-univariada, como se indicó anteriormente.

La Figura 26 exhibe el perfil de emisión y el perfil concatenado tiempo/excitación recuperados por MCR-ALS para una muestra de validación conteniendo los analitos en estudio.



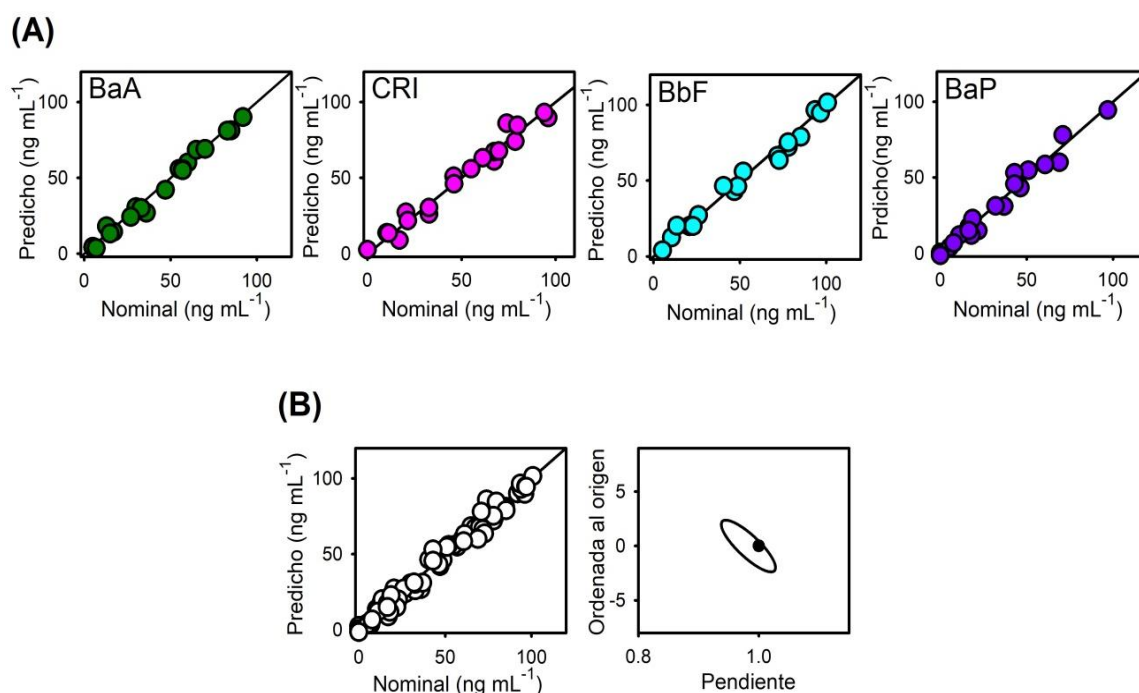
**Figura 26.** Perfiles espectrales de emisión (A) y perfiles concatenados tiempo/excitación (B) recuperados por MCR-ALS para una muestra que contiene BaA (verde), CRI (rosa), BbF (turquesa) y BaP (violeta). Las líneas grises punteadas en el gráfico B separan, primero la muestra incógnita de las sucesivas muestras de calibración, y el recuadro muestra el modo aumentado de la muestra estudiada.

La calidad de los perfiles de emisión recuperados por MCR-ALS (Figura 26A) se evaluó a través del coeficiente de similaridad ( $r$ ) entre ellos y los analitos puros



(Figura 23A)<sup>85</sup>. Los valores  $r$  calculados de 0,9600; 0,9457; 0,9230 y 0,9555 para BaA, CRI, BbF y BaP, respectivamente, indican una coincidencia satisfactoria entre dichos perfiles.

La Figura 27A muestra los buenos resultados de predicción para cada HPA en las muestras de validación, y la Figura 27B expone la predicción global y el correspondiente test de la elipse para la evaluación estadística de los resultados. Como se indicó en apartados anteriores, dado que la elipse incluye a los valores teóricamente esperados de pendiente igual a 1 y de ordenada al origen igual a cero, se puede confirmar la exactitud del método propuesto.<sup>81</sup>



**Figura 27.** (A) Gráficos individuales de concentraciones predichas en función de los valores nominales de cada HPA en muestras de validación. (B) Gráfico de concentraciones predichas en función de los valores nominales para todos los HPAs evaluados y región elíptica de confianza conjunta global incluyendo todas las predicciones. El círculo negro marcan el punto teórico (ordenada al origen = 0, pendiente = 1).

Los resultados estadísticos de las muestras de validación se complementaron con los parámetros indicadores en la Tabla 15.<sup>91</sup>

En nuestro trabajo anterior (Tabla 13, página 99), donde algunos de los HPAs

aquí estudiados se cuantificaron con datos cuadrilineales CL-MEEF, los LDs fueron 0,8; 1,0; 1,6 y 0,5 ng mL<sup>-1</sup> para BaA, CRI, BbF y BaP, respectivamente.<sup>92</sup> Estos valores se asemejan bastante a los calculados con el presente procedimiento (Tabla 15), demostrando que la sensibilidad del método no se afecta al cambiar la estrategia de trabajo. Por otro lado, aunque las selectividades en el experimento cuadrilineal, con valores de 0,78; 0,77; 0,55 y 0,56 para BaA, CRI, BbF y BaP, respectivamente, son mejores que las aquí calculadas, con valores mayores a 0,41 (Tabla 15), se puede enunciar que son aceptables teniendo en cuenta que se aplica una metodología simple a un sistema complejo en un tiempo más corto.

**Tabla 15:** Resultados estadísticos para el conjunto de HPAs en muestras de validación y muestras de prueba con el agregado de interferentes.

	<b>BaA</b>	<b>CRI</b>	<b>BbF</b>	<b>BaP</b>
<b>Muestras de validación</b>				
$\gamma$ (ng <sup>-1</sup> mL)	2,5	3,4	3,3	2,8
SEL	0,48	0,71	0,49	0,41
LD (ng mL <sup>-1</sup> )	1,4	1,0	1,1	1,3
LQ (ng mL <sup>-1</sup> )	4,3	3,1	3,2	3,8
ECMP (ng mL <sup>-1</sup> )	3	5	4	4
ERP (%)	6	9	8	9
<b>Muestras con potenciales interferentes</b>				
$\gamma$ (ng <sup>-1</sup> mL)	1,2	2,6	0,94	1,9
SEL	0,33	0,46	0,24	0,31
LD (ng mL <sup>-1</sup> )	2,9	1,3	3,8	1,8
LQ (ng mL <sup>-1</sup> )	8,9	4,1	11	5,6
ECMP (ng mL <sup>-1</sup> )	3	4	5	4
ERP (%)	5	8	9	8

$\gamma$ , sensibilidad analítica SEL, selectividad, calculado de acuerdo a Ref. [82]. LD, límite de detección, y LQ, límite de cuantificación, calculado de acuerdo a Ref. [91]. ECMP, error cuadrático medio de la predicción; ERP, error relativo de la predicción.

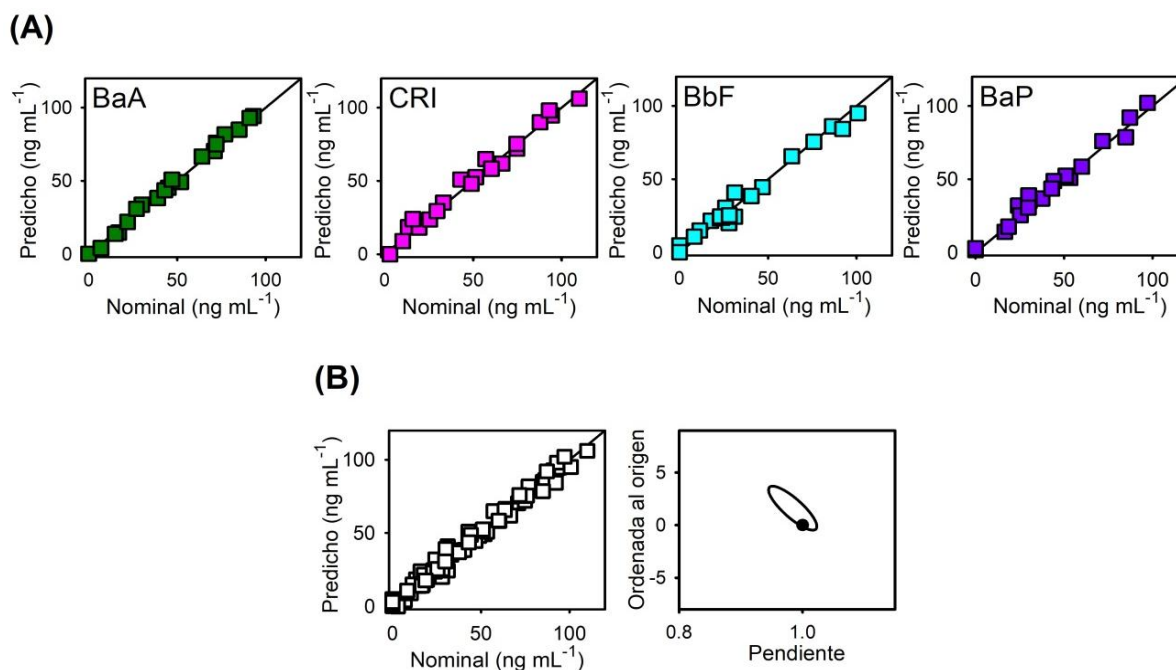
Se puede arribar a una conclusión similar al comparar los valores de sensibilidad analítica.<sup>92</sup> Finalmente, también se concluye que tanto los errores cuadráticos medios



y los errores relativos de la predicción (menores a  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  y 9 %, respectivamente) son satisfactorios.

### 4.3.3 Muestras con potenciales interferencias

La cuantificación del sistema de HPAs se realizó en presencia de otros hidrocarburos potencialmente interferentes: FE, ANT, PIR, BkF y DBA. Estos contaminantes se seleccionaron por encontrarse usualmente en muestras de té,<sup>8</sup> y porque pueden afectar la medida de las señales fluorescentes. Efectivamente, la banda cromatográfica del PIR cubre parcialmente las señales de CRI y BaA, y las bandas de BkF y DBA se superponen a la de BbF. En la Figura 23B (página 109) se puede apreciar la severa superposición espectral que presentan tanto los perfiles de excitación como los de emisión de los analitos calibrados con respecto a los no calibrados. Sin embargo, MCR-ALS permitió obtener muy buenas predicciones, corroboradas estadísticamente con el test de la elipse (Figura 28).



**Figura 28.** (A) Gráficos individuales de concentraciones predichas en función de los valores nominales para cada HPA en muestras con potenciales interferentes. (B) Gráfico de concentraciones predichas en función de los valores nominales para todos los HPAs evaluados y la correspondiente región elíptica conjunta (con 95 % de confianza) para la pendiente y la ordenada de esta regresión. El círculo negro marca el punto teórico (ordenada al origen = 0, pendiente = 1).

Los resultados estadísticos adicionales presentados en la Tabla 15 muestran, como era de esperar, que la presencia de constituyentes no calibrados produce un descenso en los valores de sensibilidad y selectividad en la predicción, si bien no parece afectar significativamente a los valores de ECMP y ERP.

Se debe tener en cuenta que las soluciones bilineales de MCR-ALS, aun al aplicar todas las restricciones, pueden mostrar cierto grado de ambigüedad rotacional. Es decir, la presencia de un área factible de soluciones que satisfacen del mismo modo el modelo bilineal y todas sus restricciones.<sup>93</sup>

Las predicciones de las muestras de validación no deberían presentar ambigüedad rotacional en la descomposición bilineal realizada por MCR-ALS, ya que el conjunto de calibración contiene cuatro muestras con un analito puro, asegurando la descomposición única de la matriz superaugmentada.<sup>94</sup> Sin embargo, para las muestras con potenciales interferentes los perfiles de los analitos pueden, en principio, mostrar ciertas áreas de soluciones factibles. En estos sistemas multicomponentes, con más de ocho constituyentes, el único algoritmo que puede analizar la presencia de ambigüedad rotacional es MCR-BANDS.<sup>95</sup> Este algoritmo estima las contribuciones máximas y mínimas de cada componente a la señal total, mediante una optimización no lineal con restricciones no lineales. En el sistema estudiado no se puede aplicar el mencionado algoritmo en su versión actual debido a la necesidad de implementar la restricción de unimodalidad en el modo tiempo de elución, separado de los perfiles excitación-tiempo que definen el modo aumentado. Sin embargo, consideramos que este fenómeno no se presentó sustancialmente en las muestras con potenciales interferentes dado que los resultados de las predicciones son los esperados y, de estar presentes la ambigüedad rotacional llevaría a un sesgo en la predicción.

Finalmente, la selectividad en el modo común de emisión es razonablemente buena para todos los componentes, conduciendo a un grado muy bajo de ambigüedad rotacional cuando los patrones de analitos puros están en la calibración, como en el presente caso.<sup>94</sup>

#### 4.3.4 Muestras de té

Con el propósito de ensayar la metodología propuesta en muestras reales, se procedió al análisis de cuatro variedades de té de origen nacional (rojo, negro, blanco y verde), obtenidos en el mercado local.

En primera instancia, se determinaron las concentraciones de los cuatros HPAs en cada muestra con cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) como método de referencia. Los resultados de ambos métodos (Tabla 16) se compararon con la prueba *t*-Student<sup>96</sup> por parejas, con *n*-1 grados de libertad y con un nivel de significancia del 95 %. El valor de *t* experimental obtenido (*t* = 0,78) fue menor al valor de *t* tabulado (*t* crítico = 2,6), sugiriendo que los resultados de los métodos no difieren significativamente (Tabla 16).

**Tabla 16:** Concentraciones de HPAs en variedades de té ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )<sup>a</sup>

	<b>BaA</b>		<b>CRI</b>		<b>BbF</b>		<b>BaP</b>	
	CG/EM	MCR-ALS <sup>b</sup>	CG/EM	MCR-ALS <sup>b</sup>	CG/EM	MCR-ALS <sup>b</sup>	CG/EM	MCR-ALS <sup>b</sup>
Rojo#1	69,1	67,3 (0,3)	83,2	83,0 (4)	46,1	48,8 (0,7)	ND	ND
Rojo#2	12,5	10,0 (0,7)	24,0	21 (5)	14,5	11 (3)	ND	ND
Verde#1	11,5	11 (1)	36,7	37 (7)	39,7	35 (2)	ND	ND
Verde#2	35,5	37,8 (0,7)	95,7	93,2 (0,9)	64,2	66,4 (0,7)	42,2	46 (3)
Negro#1	18,9	19 (1)	57,0	64 (4)	60,8	63 (9)	35,9	39 (5)
Negro#2	19,9	21 (1)	56,9	54,7 (0,8)	46,5	49 (7)	36,6	37 (2)
Blanco#1	35,0	37 (1)	29,0	28 (2)	51,9	57 (6)	48,0	42,0 (0,9)

<sup>a</sup>ND = no detectado. <sup>b</sup>Media de duplicados. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

Considerando que los estándares sanitarios de BaA, CRI, BbF y BaP calculados para el té son 1.000, 16.000, 3.800 y 600  $\mu\text{g kg}^{-1}$  respectivamente,<sup>7</sup> y que los valores encontrados en las muestras ensayadas son menores a éstos, se puede enunciar que el contenido de HPAs se encuentra en un rango seguro.

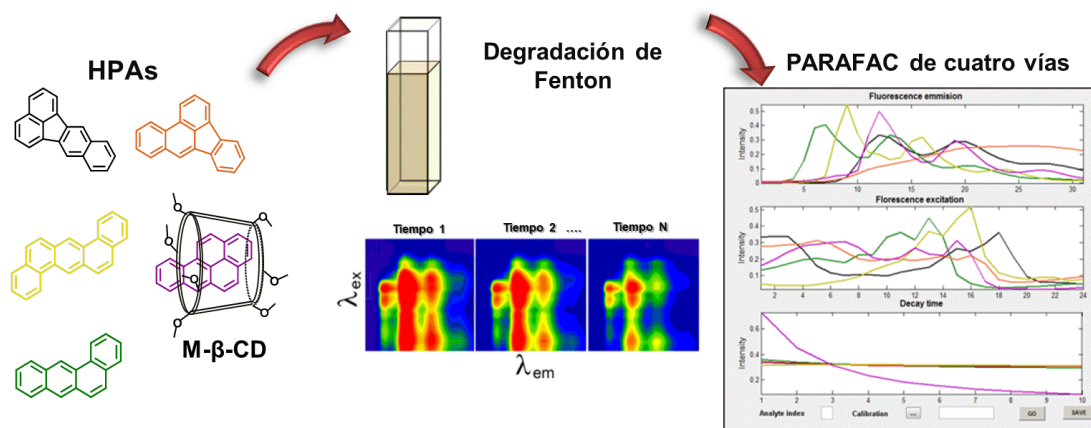
Al comparar la metodología propuesta con la de referencia, se debe remarcar que, además de no utilizar un equipamiento sofisticado, el tiempo experimentalmente requerido (aproximadamente 9 minutos por muestra) es mucho menor al involucrado con CG-EM (60 minutos por muestra) y la calidad de los resultados obtenidos es similar.

#### **4.3.5 Conclusiones parciales**

En este trabajo se registraron matrices de excitación-emisión fluorescente de HPAs a lo largo de un experimento cromatográfico, generando de esta forma datos de tercer orden de manera fácil y rápida. Debido a la fuerte dependencia de modos instrumentales se propuso una nueva estrategia del empleo del modelo MCR-ALS para el correcto tratamiento de los datos.

El método se aplicó con buenos resultados a la determinación de un conjunto de HPAs en muestras de té, demostrando que este nuevo recurso de la calibración de tercer orden/cuatro vías (concatenación de dos modos dependientes) permite mejorar la calidad de los procedimientos analíticos cuando se implementa calibración multivariada en muestras reales.

## 4.4 Generación de datos de tercer orden/cuatro vías C-MEEFs a través de la degradación de Fenton. Determinación de HPAs en muestras ambientales



En el siguiente trabajo se determinaron simultáneamente cinco HPAs pesados con calibración de tercer orden/cuatro vías. La metodología se basó en las propiedades luminiscentes de los HPAs, así como en su fácil degradación a través de la reacción de Fenton. Se siguió la evolución cinética de muestras que contenían BaP, DBA, BbF, BkF y BaA, en contacto con el reactivo de Fenton. Específicamente, se registraron las matrices de excitación-emisión de fluorescencia (MEEF) de las muestras a diferentes tiempos de reacción, obteniendo de esta manera los datos de tercer orden C-MEEF. Se logró, además, un incremento de la sensibilidad del método, llevando a cabo la reacción en presencia de M-β-CD, responsable del aumento en la señal fluorescente de los analitos.

El algoritmo PARAFAC de cuatro vías, utilizado para el procesamiento de datos, ofrece la “ventaja de segundo orden”, permitiendo que las concentraciones de los analitos se estimen aun en presencia de constituyentes no calibrados de la muestra.

A partir de los resultados obtenidos con muestras conteniendo potenciales interferentes se demostró la clara superioridad de la calibración de tercer orden respecto a la calibración de segundo orden, que se llevó a cabo a partir de las MEEFs sin someter a los analitos a la degradación de Fenton.

El método desarrollado se aplicó exitosamente a diferentes muestras de aguas. El empleo de un simple tratamiento de preconcentración en fase sólida con membranas de C18 permitió cuantificar a los analitos a niveles de partes por trillón.

#### 4.4.1 Degradación de HPAs con reacción de Fenton

El reactivo de Fenton está constituido por una mezcla de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el ion  $\text{Fe}(\text{II})$ , resultando en la generación de un fuerte agente oxidante no específico, el radical hidroxilo, formado según la siguiente ecuación:



Una característica del radical hidroxilo es que puede oxidar a la mayoría de los compuestos orgánicos (RH), por sustracción de protones, generando el radical  $\text{R}^\bullet$  que es altamente reactivo y puede seguir oxidándose:<sup>97</sup>



La reacción de Fenton se utiliza habitualmente en la degradación química de HPAs durante la remediación de aguas y aceites.<sup>98,99</sup> La mayoría de las investigaciones se centran en mejorar la eficiencia de esta degradación, modificando algunas variables tales como concentraciones de reactivos, pH y temperatura.<sup>100</sup>

En el presente trabajo las condiciones experimentales se seleccionaron considerando los siguientes puntos: 1) aumentar la sensibilidad del método, 2) llevar a cabo la oxidación en un período de tiempo razonable y 3) seleccionar condiciones experimentales amigables con ambiente.

Entre los HPAs estudiados, el BaP posee el potencial de ionización más alto y es el más susceptible a la oxidación química.<sup>101</sup> Por este motivo, la optimización de las condiciones experimental se realizó en función de su velocidad de degradación, buscando que sea lo suficientemente lenta para permitir la adquisición de sucesivas MEEFs en un tiempo de análisis relativamente corto.

El efecto del pH es de relevancia en la oxidación de Fenton, mientras algunos autores informan valores de pH ácidos ( $\text{pH} = 3\text{-}5$ ) como los más efectivos para dicha reacción,<sup>102</sup> otros investigadores comprobaron que el pH neutro es óptimo para degradar compuestos orgánicos en agua.<sup>103</sup> Específicamente, en el caso del BaP, se observó que variaciones en el rango de pH de 3,5 a 6 no produjo cambios significativos en la eficiencia de su remoción.<sup>104</sup> Por lo tanto en este estudio se trabajó a un  $\text{pH} = 5$  dado por una solución reguladora ácido acético/acetato de sodio ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Se demostró que concentraciones iniciales del ion ferroso (agente catalítico) en el rango de  $3\text{-}5,5 \text{ mg L}^{-1}$  tienen un efecto positivo en la velocidad de oxidación.<sup>103,104</sup> Una concentración inicial de  $\text{Fe(II)}$  de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  permitió una velocidad de reacción apropiada sin exceder el límite permitido por la Comunidad Económica Europea para la descarte de hierro directamente descargado en el ambiente.<sup>104</sup>

El efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno se evaluó de 5 a 20 mg. Se seleccionó un valor de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  dado que altas concentraciones de este reactivo aumenta la velocidad de degradación de BaP.

En relación a la temperatura de trabajo, se conoce que temperaturas mayores a los  $30^\circ\text{C}$  producen un aumento en la reacción de degradación,<sup>103</sup> y por lo tanto se efectuaron experimentos preliminares a 10, 15 y  $20^\circ\text{C}$ .

Dado que no se observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos, todas las medidas se desarrollaron a 20 °C.

Se adicionaron distintas CDs a las soluciones de trabajo con el propósito de incrementar la sensibilidad de la detección fluorescente y la solubilidad de los HPAs a través de la formación de complejos de inclusión.

Ciertas CDs poseen la capacidad de coordinar simultáneamente al ion hierro y a compuestos orgánicos hidrofóbicos, y esta habilidad se utilizó para mejorar la eficiencia de la reacción de Fenton.<sup>105</sup> Veigne y col. concluyeron que la degradación de Fenton del BaP está fuertemente limitada por la capacidad de la CD de solubilizar este HPA.<sup>98</sup> Otras investigaciones sugirieron que la HP- $\beta$ -CD formaría un complejo ternario HP- $\beta$ -CD-BaP-Fe, que permitiría generar radicales hidroxilo en las cercanías del BaP minimizando así la degradación de la HP- $\beta$ -CD. También se propuso la formación de un complejo ternario HP- $\beta$ -CD-fenantreno-Fe para explicar la efectiva degradación de este contaminante en presencia de HP- $\beta$ -CD usando un proceso electro-Fenton.<sup>106</sup>

De las CDs ensayadas en este trabajo,  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD y M- $\beta$ -CD, esta última produjo un importante aumento de la intensidad de fluorescencia del DBA, que es el menos fluorescente de los analitos estudiados. Por otro lado, con M- $\beta$ -CD se consigue un compromiso razonable entre el tiempo de degradación de los HPAs y la velocidad de adquisición de datos. Dados estos aspectos positivos se utilizó M- $\beta$ -CD (0,01 mol L<sup>-1</sup>) en gran exceso con respecto a la concentración de analitos, asegurando su fácil disolución y un aumento importante de sus señales fluorescentes. A continuación, en la Tabla 17 se resumen las condiciones experimentales empleadas.



**Tabla 17:** Condiciones experimentales seleccionadas.

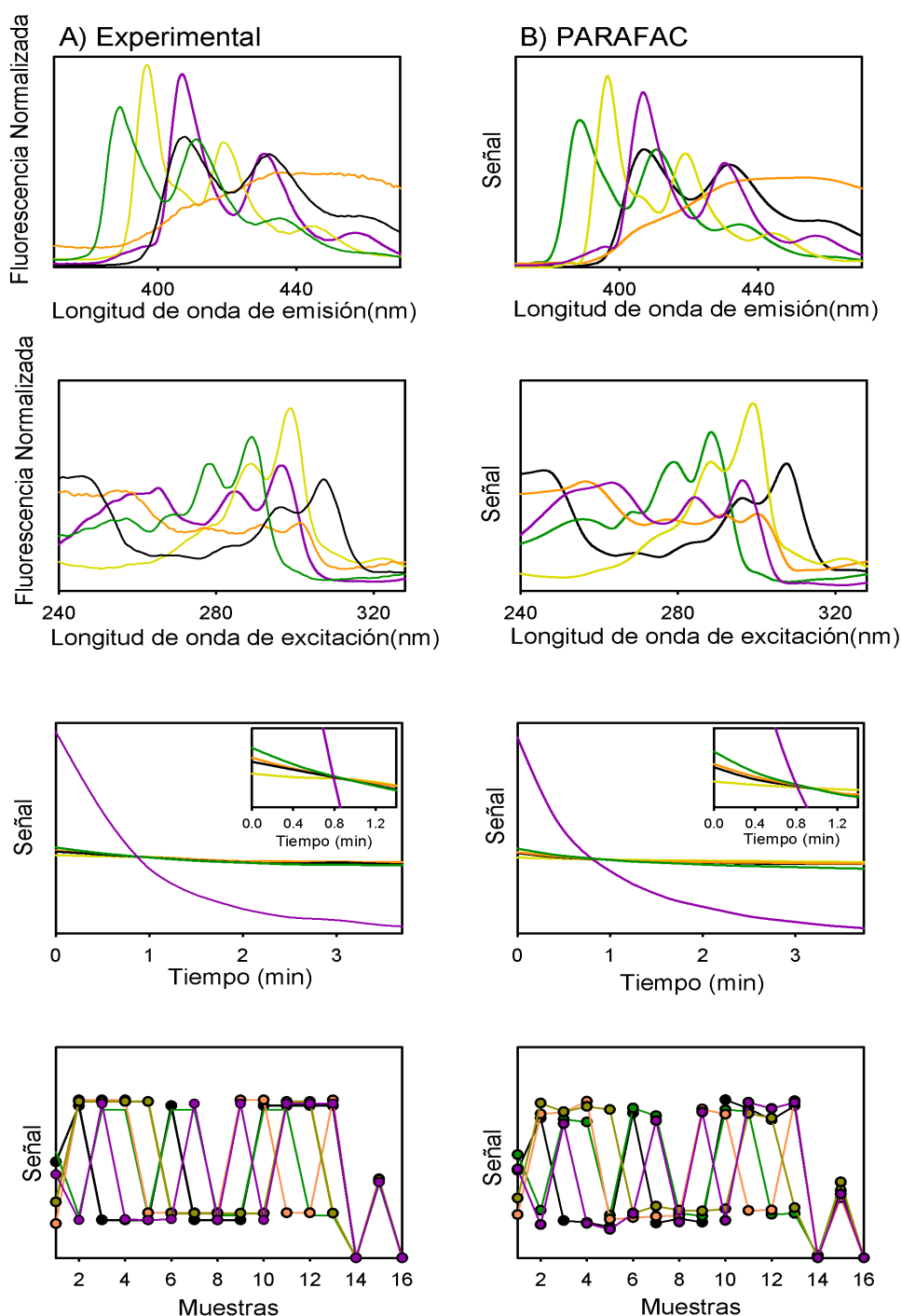
pH	5 (ácido acético/acetato de sodio 0,01 mol)
$C_{\text{Fe (II)}}$	2 (mg L <sup>-1</sup> )
$C_{\text{H}_2\text{O}_2}$	5 (mg L <sup>-1</sup> )
Temperatura	20 °C
$C_{\text{M-}\beta\text{-CD}}$	0,01 (mol L <sup>-1</sup> )

#### 4.4.2 Datos de tercer orden C-MEEFs

Los HPAs seleccionados, BaP, DBA, BbF, BkF y BaA, poseen espectros de excitación y emisión ubicados en la misma región espectral, produciendo una superposición que impide la directa determinación simultánea de los analitos por calibración univariada (Figura 29). Como es de esperar, la situación sería más compleja en muestras reales, donde se sumaría la presencia de otros constituyentes en cada matriz.

Los algoritmos de calibración multivariada proporcionan una solución al problema de interferencias espectrales, especialmente cuando se trabaja con datos de orden dos o mayor a dos.

Dado que los algoritmos de segundo orden permiten extraer directamente las concentraciones y los perfiles espectrales de los componentes de la muestra, el sistema en estudio puede resolverse en principio empleando MEEFs y calibración de segundo orden.



**Figura 29.** Perfiles espectrales, cinéticos y de concentración en las muestras de calibrado para cada HPA: (A) obtenidos experimentalmente, y (B) modelados con PARAFAC para una muestra de validación. BaP (violeta), DBA (amarillo), BbF (naranja), BkF (negro), y BaA (verde) a pH 5 y en presencia de M- $\beta$ -CD.

Sin embargo, una opción más eficaz para sistemas complejos con una importante superposición espectral es el empleo de calibración de tercer orden.<sup>107</sup> Este tipo de calibración, como vimos anteriormente, al igual que la de segundo orden, posee la propiedad que denominamos “ventaja de segundo orden”, debido a que es una

característica intrínseca a los datos de orden superior, proporcionando un aumento en el poder de resolución con alta sensibilidad.<sup>107</sup> La mayor sensibilidad en esta calibración se atribuye al aumento en el orden de los datos, que genera una disminución en el impacto relativo del ruido en la señal. También se observa un incremento en la selectividad, dado que cada nuevo modo instrumental adicionado contribuye de manera positiva a la selectividad total.

En este trabajo el tercer modo (modo temporal) se midió sometiendo al sistema dado a la reacción de Fenton, bajo condiciones experimentales previamente ensayadas (Tabla 17).

Aunque el comportamiento cinético del BaP se distingue marcadamente del resto, los demás HPAs también poseen una velocidad de decaimiento característica, agregando selectividad a la resolución de cada componente.

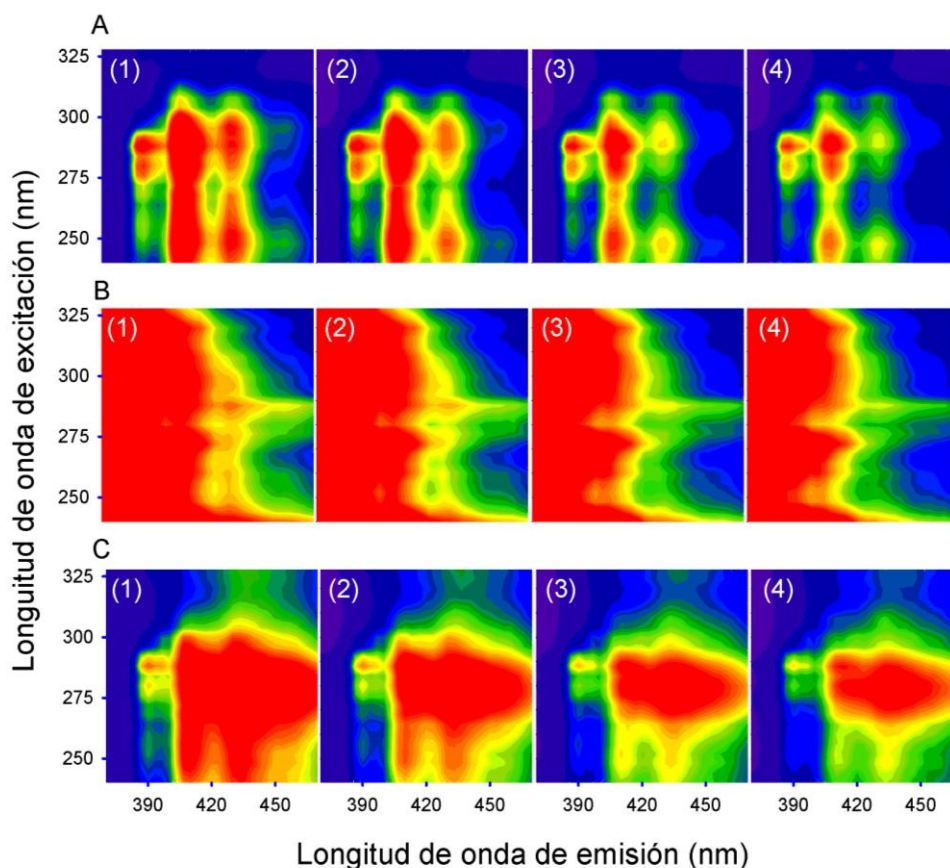
En una primer etapa, se obtuvieron las C-MEEFs de las muestras de calibración y validación, que solo contenían los cinco analitos del sistema en estudio. Posteriormente, se prepararon muestras más complejas, que incluyeron potenciales interferencias y, de acuerdo a sus diferentes grados de complejidad, se las clasificó como muestras de prueba N° 1 y N° 2.

Existen diversos algoritmos para modelar datos de tercer orden, sin embargo cuando se utilizan datos de C-MEEF que cumplen con la condición de cuatrilínealidad el algoritmo más conveniente por su simplicidad es PARAFAC de cuatro vías.

#### **4.4.3 Muestras de validación**

El método se validó a través del procesamiento de muestras de validación y el correspondiente cálculo de recuperaciones y cifras de mérito.

En la Figura 30 se muestran los gráficos de contorno excitación-emisión fluorescente en función de diferentes tiempos de reacción de una muestra de validación sometida al reactivo de Fenton en las condiciones seleccionadas. Como se puede observar, hay una disminución de la señal fluorescente total en función del tiempo de reacción.



**Figura 30.** Gráficos de contorno de matrices de excitación-emisión de fluorescencia de muestras de validación (A), de pruebas N° 1 (B) y de pruebas N° 2 (C) durante la degradación de Fenton a los siguientes tiempos de reacción: (1) 0 min, (2) 0,42 min, (3) 1,67 min y (4) 3,75 min.

El algoritmo PARAFAC se inicializó por medio de descomposición en valores singulares (DVS), y tanto en los *scores* como en los *loadings* se aplicaron restricciones de no-negatividad durante la etapa de ajuste por cuadrados mínimos alternantes. El número de componentes se calculó mediante el análisis de los residuos de PARAFAC<sup>58</sup> y también teniendo en cuenta los perfiles espectrales modelados

frente al agregado de un componente adicional. Si la incorporación de ese nuevo componente en el modelado generaba un perfil espectral repetido, sugiriendo sobreajuste, dicho componente se descartó y se seleccionó como número de componentes el valor previo alcanzado.

En nuestro sistema, se requirieron cinco componentes para describir correctamente la variabilidad del arreglo de datos, produciendo perfiles espectrales y cinéticos muy semejantes a los experimentales (Figura 29A y Figura 29B).

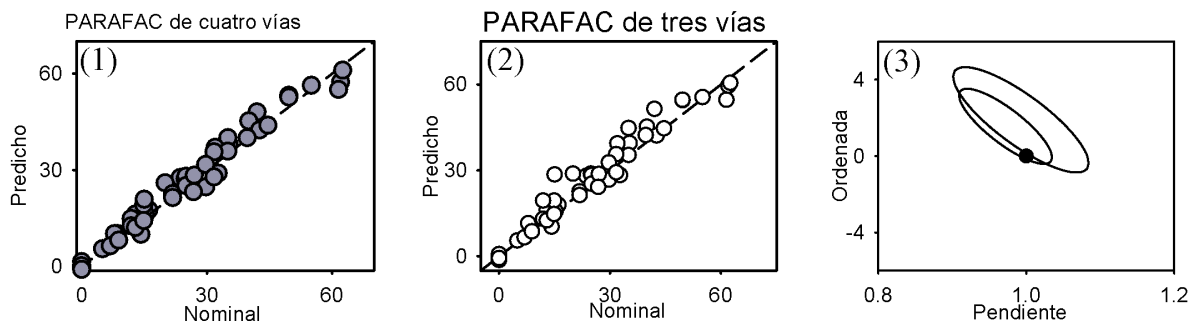
La calidad de los perfiles recuperados por PARAFAC se cuatro vías se evaluaron siguiendo el criterio de similaridad, que implica la comparación a través del coeficiente de similaridad ( $r$ ) entre los perfiles de referencia (Figura 29A) y los predichos (Figura 29B).

Los valores de  $r$  calculados para BaP, DBA, BbF, BkF y BaA fueron respectivamente, 0,9948; 0,9928; 0,9874; 0,9990; 0,9972 para los perfiles de emisión, 0,9938; 0,9937; 0,9938; 0,9979; 0,9978 para los perfiles de excitación y 0,9973; 0,9996; 0,9999; 0,9937; 0,9942 para los perfiles cinéticos. Estos valores corroboran la excelente calidad de los resultados obtenidos a partir de PARAFAC de cuatro vías. Además, la Figura 29A y la Figura 29B muestran los perfiles de los scores para una muestra de validación y todas las muestras de calibración. Se concluye que existe una buena correlación entre las concentraciones nominales de analito (Figura 31A) y los *scores* de los componentes de PARAFAC de cuatro vías (Figura 31B).

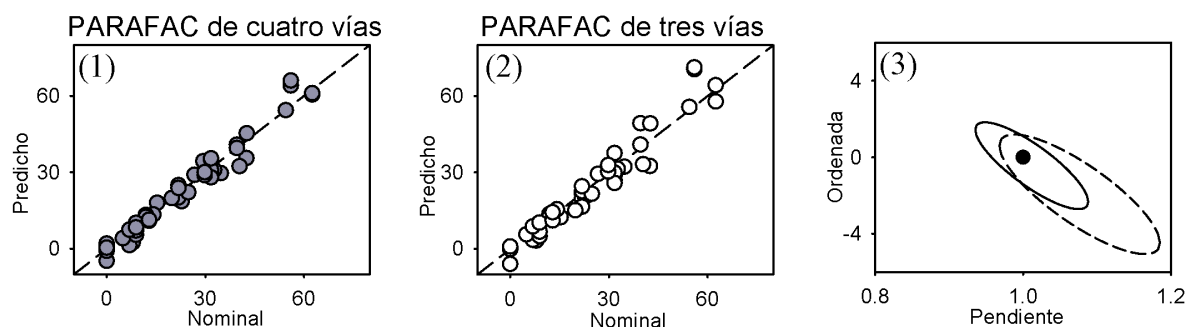
El análisis de estos resultados en relación a los obtenidos cuando se procesan las MEEFs de segundo orden de las mismas muestras de validación con PARAFAC de

tres vías (Figura 31) sugiere que si bien ambas predicciones son buenas, se verifica una mayor dispersión en el segundo caso.

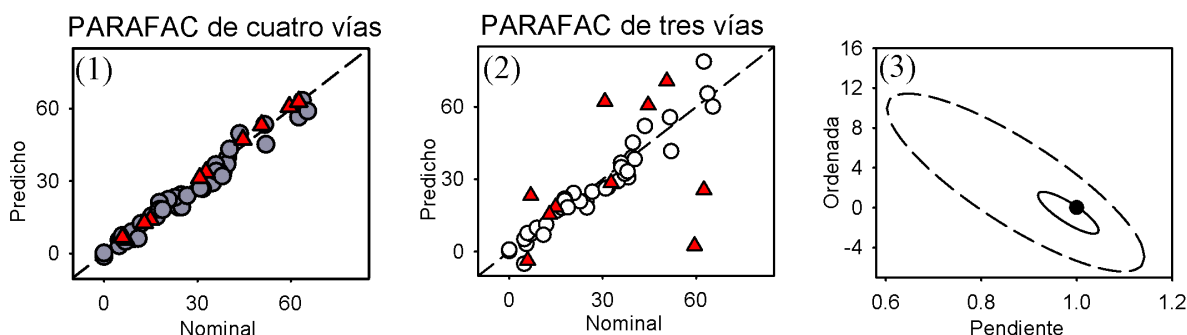
### (A) Muestras de validación



### (B) Conjunto de prueba N° 1



### (C) Conjunto de prueba N° 2



**Figura 31.** Gráficos de concentraciones predichas vs nominales ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) de los cinco HPAs obtenidos con PARAFAC de cuatro vías (1) y con PARAFAC de tres vías (2), y regiones elípticas de confianza para la pendiente y la ordenada al origen de la regresión de PARAFAC de cuatro vías (línea continua) y de tres vías (líneas discontinua) (3) para: (A) las muestras de validación, (B) las muestras del conjunto de prueba N° 1, y (C) las muestras del conjunto de prueba N° 2. Los triángulos rojos ▲ en C (1 y 2) muestran las predicciones para BbF. Los círculos negros en las elipses marcan el punto teórico (ordenada al origen = 0, pendiente = 1).

Ambos tipos de calibración se compararon mediante el test de la elipse EJCR, que consiste, como se explicó previamente, en graficar la región de confianza conjunta (al 95% de confianza) entre la pendiente y la ordenada al origen obtenidas en las regresiones de las concentraciones nominales vs las concentraciones predichas.<sup>81</sup> Dado que varios analitos se determinaron simultáneamente, según lo sugerido en la literatura,<sup>108</sup> el test de la región de confianza se calculó considerando los datos experimentales correspondientes a todos los analitos en su conjunto. Cuando el test se aplica a los datos correspondientes a cada analito por separado, la variancia obtenida puede ser sobrestimada, generando una mayor región de confianza e incrementando la probabilidad de no detectar la presencia de sesgo.<sup>85</sup> Como puede observarse en la Figura 31, las elipses incluyeron al valor teóricamente esperado de pendiente igual a 1 y ordenada al origen igual a 0, lo que indica la exactitud de las dos metodologías.

En la Tabla 18 se exponen las cifras de mérito de los resultados de ambas calibraciones para muestras de validación. Los ECMs y los ERPs calculados a partir de la concentración media de la calibración de cada analito son ligeramente más bajos en calibración de tercer orden, con mejores valores de sensibilidad. La diferencia en selectividad es más marcada en el caso del BaP, con su distintivo perfil cinético.

La favorable influencia de la M- $\beta$ -CD en la intensidad de fluorescencia de los analitos y los beneficios del tercer orden se manifiesta en los buenos LDs y LQs obtenidos con el método propuesto.

**Tabla 18:** Resultados estadísticos del conjunto de HPAs en muestras de validación utilizando datos de tercer orden C-MEEF y datos de segundo orden MEEF.

	C-MEEF					MEEF				
	BaP	DBA	BbF	BkF	BaA	BaP	DBA	BbF	BkF	BaA
Conjunto de validación										
ECMP/ng mL <sup>-1</sup>	3,1	4,1	3,5	1,4	2,4	4,0	5,9	5,4	1,5	2,8
ERP/%	9	11	10	7	7	11	17	15	8	8
Sensibilidad/UF ng <sup>-1</sup> mL	34	27	29	120	70	19	8,4	9,4	37	21
γ/ng <sup>-1</sup> mL	16	12	14	55	33	10	4,7	5,2	21	12
Selectividad	0,73	0,81	0,66	0,60	0,77	0,58	0,82	0,66	0,54	0,66
LD/ng mL <sup>-1</sup>	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,5	0,8	0,7	0,3	0,5
LQ/ng mL <sup>-1</sup>	1,1	1,3	1,2	0,9	1,0	1,4	2,5	2,2	1,0	1,4
Conjunto de prueba N°1										
ECMP/ng mL <sup>-1</sup>	4,0	3,9	2,9	2,0	3,5	4,1	5,6	4,8	2,7	5,6
ERP/%	11	11	8	10	10	12	17	14	13	16
Sensibilidad/UF ng <sup>-1</sup> mL	32	11	7	85	29	10	2,9	0,5	26	9,3
γ/ng <sup>-1</sup> mL	3,3	1,1	2,8	8,8	3	1,7	0,5	0,04	4,3	1,5
Selectividad	0,61	0,31	0,14	0,37	0,34	0,31	0,28	0,20	0,32	0,30
LD/ng mL <sup>-1</sup>	1,1	3,2	3,0	0,5	1,2	2,1	7,5	15	0,9	2,4
LQ/ng mL <sup>-1</sup>	3,4	9,7	9,0	1,5	3,7	6,5	23	45	2,7	7,1
Conjunto de prueba N° 2										
ECMP/ng mL <sup>-1</sup>	2,9	2,9	1,4	3,5	4,1	3,8	7,1	<sup>a</sup>	3,6	4,3
ERP/%	8	8	4	17	11	11	20	<sup>a</sup>	18	12
Sensibilidad/UF ng <sup>-1</sup> mL	24	19	3	68	32	8,2	2,3	<sup>a</sup>	12	4,4
γ/ng <sup>-1</sup> mL	5,3	4,3	0,7	15	7,1	2,2	0,6	<sup>a</sup>	3,2	1,2
Selectividad	0,51	0,55	0,08	0,35	0,35	0,25	0,22	<sup>a</sup>	0,19	0,14
LD/ng mL <sup>-1</sup>	0,7	0,9	5,0	0,4	0,6	1,7	5,9	<sup>a</sup>	1,2	3,1
LQ/ng mL <sup>-1</sup>	2,2	2,7	16	1,1	1,8	5,1	18	<sup>a</sup>	3,5	9,5

ECMP, Error cuadrático medio de la predicción; ERP error relativo de la predicción; UF unidades de fluorescencia; γ, sensibilidad analítica; LD, límite de detección; LQ límite de cuantificación. Sensibilidad, selectividad, LD y LQ se calcularon según Ref. [82].

<sup>a</sup> No se puede predecir (ver texto).

Cabe destacar que estos límites se estiman usando las expresiones recomendadas por Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC),<sup>82</sup> ecuación (9) detallada anteriormente en la página 81, que tiene en cuenta los errores tipo I (falsos detectables) y tipo II (falsos no detectables) y la propagación de los errores de pendiente y ordenada al origen de las rectas de calibración en el resultado de la

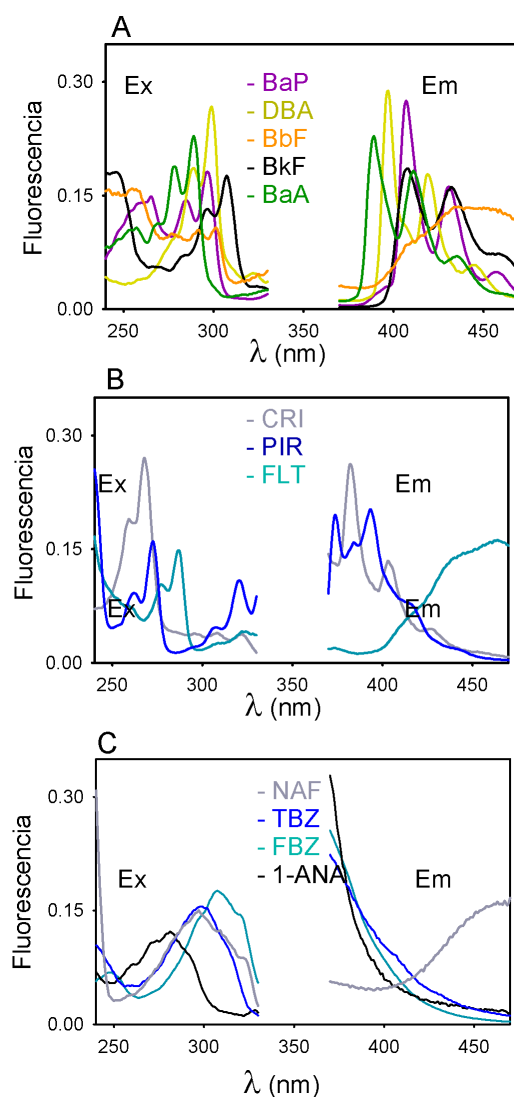


predicción. De la misma manera, el límite de cuantificación (LQ) se calculó utilizando la expresión sugerida por IUPAC [ ecuación (19), página 100].

#### **4.4.4 Conjunto de prueba N° 1**

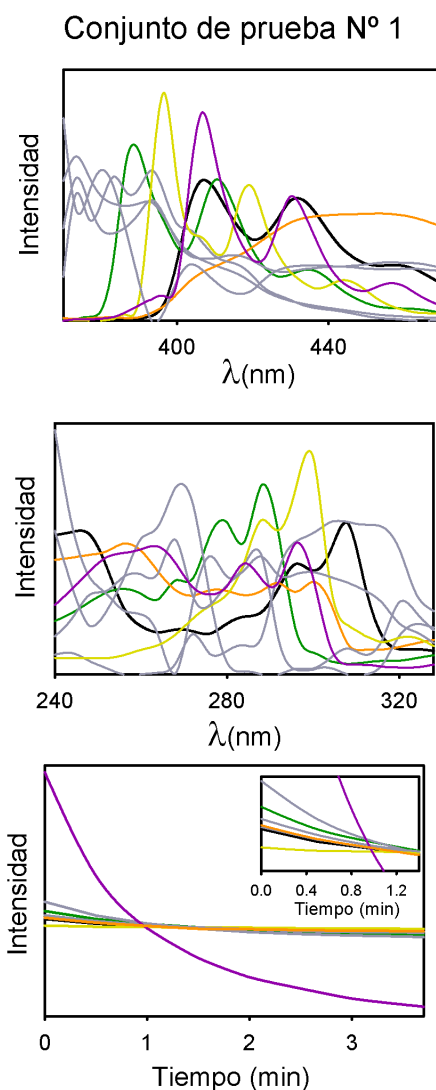
Las muestras de prueba, conteniendo constituyentes adicionales que no se encuentran presentes en las soluciones de calibración y validación, se emplean frecuentemente en calibración multivía para examinar la capacidad de los modelos de distinguir la presencia de compuestos diferentes a los analitos. Es decir, el análisis de este tipo de muestras permite apreciar la habilidad del método de solucionar el problema de la presencia de potenciales interferentes en las matrices a analizar.

Entre diferentes contaminantes comunes y prioritarios, los hidrocarburos CRI, PIR y FLT y los agroquímicos TBZ, FBZ, 1-ANA y NAF muestran señales fluorescentes superpuestas con las señales de los analitos en estudio (Figura 32). Además, si se adicionan altas concentraciones relativas de estos potenciales contaminantes las señales de los HPAs en estudio quedan totalmente enmascaradas, remarcando la importancia de recurrir a la “ventaja de segundo orden” para resolver el sistema. Por lo tanto se prepararon diez muestras con diferentes concentraciones de los analitos y los contaminantes mencionados, y se evaluaron con PARAFAC de tres vías y PARAFAC de cuatro vías.



**Figura 32.** Espectros de excitación y emisión fluorescente normalizados, en presencia de  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de M- $\beta$ -CD del sistema de analitos estudiados (A), HPAs seleccionados (B), y agroquímicos seleccionados (C).

En la Figura 33 se puede observar la evolución en el tiempo de una MEEF durante la degradación de Fenton de una muestra conteniendo HPAs y agroquímicos como potenciales interferentes (muestra del conjunto de prueba N°1). En esta figura se pone en evidencia el desafío analítico que representa resolver un sistema donde los perfiles de los analitos no se pueden distinguir fácilmente de los interferentes.



**Figura 33.** Perfiles espectrales y cinéticos predichos por PARAFAC para el conjunto de prueba N° 1. Violeta (BaP), amarillo (DBA), naranja (BbF), negro (BkF) y verde (BaA). Las señales interferentes se muestran en color gris.

El número de componentes totales requeridos por PARAFAC de cuatro vías en estas muestras de prueba varió entre seis y nueve, y se establecieron de igual manera que en las muestras de validación. Es frecuente que cuando varios componentes inesperados están presentes en las muestras de prueba, los perfiles recuperados por PARAFAC no sean semejantes a los de los interferentes en forma individual.<sup>109</sup>

Como se aprecia en la Figura 33, mientras que los perfiles de cada analito se recuperan correctamente por PARAFAC de cuatro vías, los de algunos interferentes se muestran como combinaciones lineales de los perfiles puros. Este hecho no tiene

influencia en las predicciones de los valores de concentración ni en las cifras de mérito calculadas (Tabla 18).

La presencia de compuestos no calibrados en la muestras disminuye los valores de selectividad, y los LDs de DBA y BbF son ligeramente mayores a los obtenidos con las muestras de validación.

En el caso de DBA, este hecho puede atribuirse a la similitud entre su espectro de excitación y el de FLT, y en el caso del BbF, es evidente que su perfil de emisión es muy semejante a los del FL y 1-ANA (Figura 32).

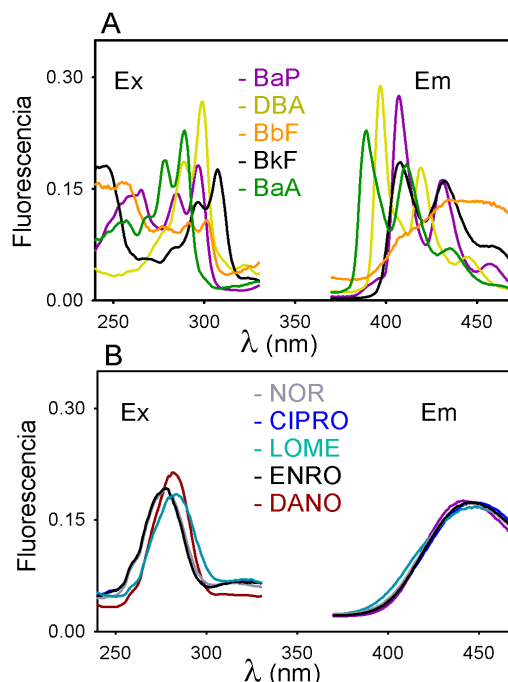
Aunque la cuantificación de los analitos llevada a cabo con MEEFs y PARAFAC de tres vías rindió resultados exactos (Figura 33), se verificó una menor precisión en las recuperaciones obtenidas. Las diferencias entre ambos tipos de calibración son más evidentes en el tamaño de las correspondientes elipses (Figura 31, página 20) y los valores estadísticos presentados en la Tabla 18 (página 131). Como una conclusión parcial podemos decir que el agregado de un tercer modo a la calibración (modo cinético) tiene un impacto positivo en la resolución del sistema.

#### **4.4.5 Conjunto de prueba N° 2**

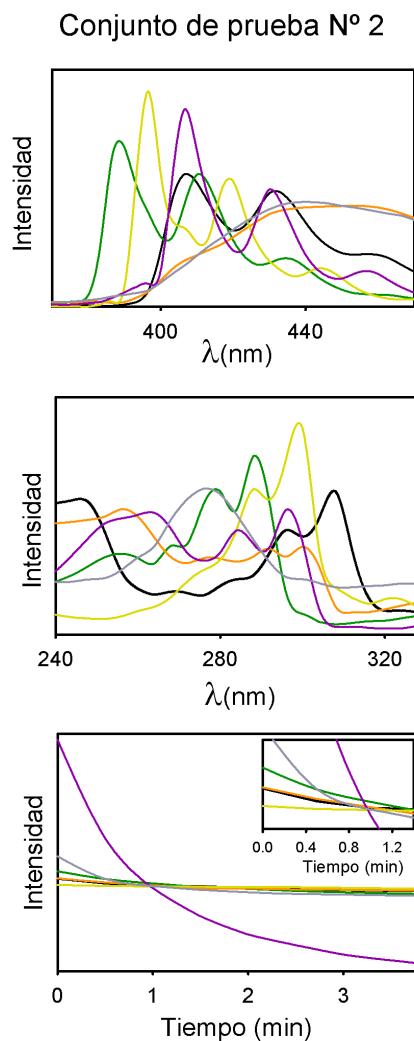
Con el objetivo de evaluar la capacidad de PARAFAC de cuatro vías para resolver sistemas que no dan buenos resultados con PARAFAC de tres vías y datos de segundo orden, se procesó un nuevo conjunto de muestras. A este sistema, conformado por los analitos en estudio e interferentes de la familia de las fluoroquinolonas, se lo denominó conjunto de prueba N° 2. Los espectros de emisión fluorescente de las cinco fluoroquinolonas analizadas son muy similares entre sí y a su vez similares al perfil de emisión del BbF (Figura 34). En principio, la calibración de tercer orden podría solucionar este problema dado que los perfiles de los

interferentes en el modo adicional son distintos a los del BbF. La Figura 35 muestra la degradación de Fenton de una muestra del conjunto de prueba N° 2 a través de los correspondientes gráficos de contorno de las MEEFs a diferentes tiempos de evolución de la reacción.

En esta figura se puede observar como disminuye la señal fluorescente a medida que avanza la degradación para el conjunto de prueba N° 2. Estas muestras se modelaron con PARAFAC de cuatro vías utilizando seis componentes, ya que este algoritmo recupera los perfiles espectrales de las cinco fluoroquinolonas como un solo componente (Figura 35). Aunque el espectro de emisión fluorescente de las fluoroquinolonas y el BbF son similares, los diferentes perfiles cinéticos y de excitación fluorescente serían los responsables de la selectividad hacia este hidrocarburo.



**Figura 34.** Espectros de excitación y emisión fluorescente normalizados, en presencia de  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de M- $\beta$ -CD para el sistema de analitos (A), y las cinco fluoroquinolonas (B). Las señales fluorescentes se encuentran normalizadas.



**Figura 35.** Perfiles espectrales y cinéticos predichos por PARAFAC para el conjunto de prueba N° 2. Violeta (BaP), amarillo (DBA), naranja (BbF), negro (BkF) y verde (BaA). Las señales interferentes se muestran en color gris.

Tanto los valores predichos por PARAFAC de cuatro vías (Figura 35) para las concentraciones de los HPAs como los resultados estadísticos obtenidos (Tabla 18, página 131), indican que ni la sensibilidad ni la selectividad del método se afecta seriamente por la presencia de las fluoroquinolonas. Aunque el límite de detección para el BbF es mayor que en las muestras del conjunto de prueba N° 1, se mantiene a nivel de partes por billón.

En el caso de PARAFAC de tres vías, se puede perder la ventaja de segundo orden cuando un constituyente no calibrado posee un perfil muy similar al de un analito en uno de los modos, aun cuando se verifica selectividad en ambos modos para los

constituyentes calibrados. Este fenómeno ocurre en este sistema con el BbF y las fluoroquinolonas, y es por ello que la concentración de este analito no fue predicha correctamente por PARAFAC de tres vías (Tabla 18, página 131).

Al comparar los resultados obtenidos con PARAFAC de cuatros vías y PARAFAC de tres vías (Figura 35, Tabla 18), se concluye que el procesamiento de datos de segundo orden resulta en una mayor dispersión en los valores de recuperación para los analitos BaP, DBA, BkF y BbF, y una predicción incorrecta en las concentraciones de BbF. Se corrobora, además, una mejor precisión de la calibración de tercer orden/cuatro vías a través del tamaño de las correspondientes elipses que surgen del test EJCR.

En algunas publicaciones se ha sugerido que los datos de tercer orden sólo poseen como ventaja la otorgada por la “ventaja de segundo orden”.<sup>110</sup> Sin embargo, Kang y col. recientemente resolvieron un sistema con colinealidad espectral a través de un arreglo de cuatro vías MEEFs-pH, y enunciaron que la resolución del sistema fue exitosa en virtud de la “ventaja de tercer orden”.<sup>48</sup>

#### 4.4.6 Muestras reales

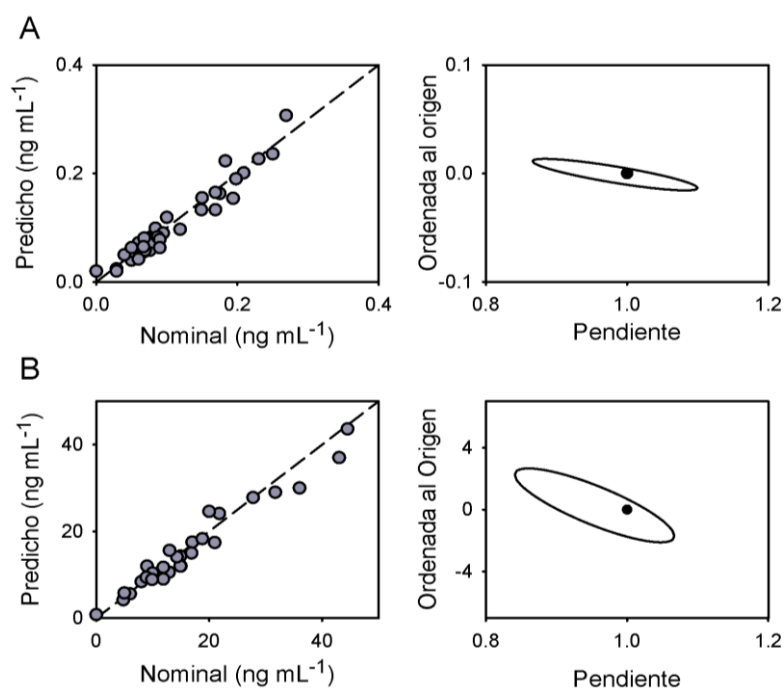
En base a los resultados anteriores, se seleccionó calibración de tercer orden/cuatro vías para el análisis de muestras de aguas reales. Es importante tener en cuenta que la contaminación de HPAs en aguas naturales puede provenir de diferentes fuentes como: derrames de petróleo durante su transporte, perforaciones de pozos de petróleo, aguas residuales de actividades industriales, etc.<sup>111</sup> Es por ello que los niveles de HPAs frecuentemente encontrados en aguas superficiales varían desde parte por trillón a partes por billón en áreas contaminadas.<sup>86,87</sup>

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA) estableció

para el control de agua potable para consumo un máximo nivel de contaminantes (MNCs) de  $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$  para el BaP, BbF y BkF;  $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$  para el BaA y  $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$  para el DBA.<sup>112</sup>

Debido a que las aguas analizadas no contenían HPAs, se enriquecieron con los analitos y con los potenciales interferentes, para luego evaluar su recuperación. Con el fin de cubrir un amplio rango de concentraciones, se evaluaron las muestras de aguas con y sin preconcentrar (Tabla 19).

Dado los diferentes niveles de HPAs en muestras con y sin preconcentración, el test estadístico de la elipse se aplicó separadamente en cada caso. Las elipses obtenidas (Figura 36) muestran que no hay diferencia significativa entre las concentraciones nominales y predichas, sugiriendo que ni los componentes no calibrados adicionales ni los constituyentes propios de cada matriz interfirieron en nuestro análisis.



**Figura 36.** Gráficos de concentraciones predichas por PARAFAC de cuatro vías en función de los valores nominales de los cinco HPAs en muestras de aguas, con y sin preconcentrar (A y B, respectivamente), en presencia de potenciales interferentes, y las correspondientes regiones elípticas de confianza conjunta al 95% de confianza. Los círculos negros marcan el punto teórico ordenada al origen = 0, pendiente = 1.



**Tabla 19:** Recuperaciones de los cinco HPAs en muestras de aguas adicionadas en presencia de potenciales interferentes utilizando calibración de cuatro vías.<sup>a</sup>

	<b>BaP</b>		<b>DBA</b>		<b>BbF</b>		<b>BkF</b>		<b>BaA</b>	
	Nominal	Predicho	Nominal	Predicho	Nominal	Predicho	Nominal	Predicho	Nominal	Predicho
<b>Sin EFS</b>										
Agua I	10,0	9,5 (95)	12,9	10,6 (82)	10,0	10,4 (104)	11,9	9,0 (76)	14,3	14,1 (99)
	15,0	12,0 (80)	18,8	18,3 (97)	14,9	14,3 (96)	14,9	12,0 (81)	11,9	11,7 (98)
Agua II	21,0	17,4 (83)	21,8	24,1 (110)	31,7	29,0 (91)	8,9	9,4 (106)	13,0	15,6 (120)
	17,0	17,5 (103)	27,8	27,8 (100)	20,0	24,6 (123)	16,9	15,0 (89)	9,9	8,9 (90)
Agua III	6,0	5,6 (93)	9,0	11,1 (123)	0	0,8 (--)	5,0	5,8 (116)	46,1	50,6 (110)
	4,8	4,2 (88)	8,0	8,4 (105)	44,5	43,6 (98)	36,0	30,0 (83)	43,0	37,0 (86)
<b>Con EFS<sup>b</sup></b>										
Agua II <sup>c</sup>	0,150	0,155 (103)	0,00	0,020 (--)	0,269	0,307 (114)	0,230	0,227 (99)	0,198	0,190 (96)
Agua II <sup>d</sup>	0,029	0,024 (83)	0,029	0,020 (69)	0,060	0,072 (120)	0,048	0,056 (116)	0,040	0,050 (125)
Agua III <sup>c</sup>	0,071	0,064 (90)	0,067	0,055 (82)	0,076	0,082 (107)	0,069	0,058 (84)	0,050	0,063 (126)
Agua III <sup>d</sup>	0,050	0,040 (80)	0,050	0,060 (120)	0,119	0,097 (82)	0,080	0,073 (91)	0,087	0,083 (95)
Agua IV <sup>c</sup>	0,087	0,085 (98)	0,084	0,099 (117)	0,100	0,119 (119)	0,095	0,090 (95)	0,090	0,078 (87)
Agua IV <sup>d</sup>	0,072	0,060 (83)	0,076	0,058 (76)	0,079	0,078 (99)	0,068	0,081 (119)	0,060	0,042 (70)
Agua V <sup>c</sup>	0,194	0,154 (79)	0,209	0,201 (96)	0,175	0,163 (93)	0,149	0,133 (89)	0,067	0,065 (97)
Agua V <sup>e</sup>	0,169	0,133 (79)	0,183	0,223 (122)	0,169	0,165 (98)	0,250	0,236 (94)	0,090	0,063 (70)

<sup>a</sup> Agua I: agua de zanja de la ciudad de Funes (Santa Fe, Argentina), Agua II: Agua subterránea de la ciudad de Funes (Santa Fe, Argentina), Agua III: agua del arroyo Ludueña (Santa Fe, Argentina), Agua IV: agua de pozo de la ciudad de Santa Rosa (La Pampa, Argentina), Agua V: Agua subterránea de la ciudad de Venado Tuerto (Santa Fe, Argentina), Concentraciones expresadas en ng mL<sup>-1</sup> y su recuperación es dada en porcentaje (entre paréntesis), Las concentraciones de los interferentes adicionados se encuentra en el rango 100–1000 ng mL<sup>-1</sup>, <sup>b</sup> Valores en las muestras de agua antes de EFS. Volumen de agua tratado = <sup>c</sup> 200 mL, <sup>d</sup> 500 mL, <sup>e</sup> 100 mL.

#### 4.4.7 Conclusiones parciales

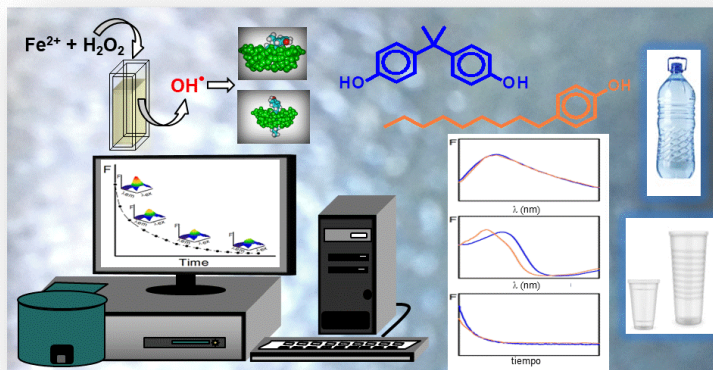
En esta etapa del trabajo doctoral se investigó una nueva aplicación de datos de tercer orden conformados por matrices de excitación-emisión de fluorescencia acoplados a una cinética de reacción (C-MEEF) para la cuantificación de cinco HPAs pesados en muestras ambientales.

La estrategia de obtención de los datos se basó en las medidas de las matrices excitación-emisión de los analitos durante la degradación de Fenton, permitiendo determinar mezclas de HPAs en presencia de interferentes como fluoroquinolonas, agroquímicos y otros hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Se comprobó que la calibración de segundo orden con matrices de excitación-emisión de fluorescencia no sometidas a Fenton solo presentó buena sensibilidad para mezclas simples de HPAs, mientras que la calibración de tercer orden, aun en presencia de interferentes, provee muy buena sensibilidad y precisión. Específicamente, las fluoroquinolonas investigadas como potenciales interferentes representaron un desafío quimiométrico debido a la semejanza de sus espectros de emisión con el de BbF. Sin embargo, su presencia no fue un problema al aplicar la calibración propuesta. Este resultado confirmaría la existencia de la “ventaja de tercer orden”.

Por otro lado, se debe destacar que la reacción de Fenton no solo degrada los compuestos en estudio sino también la materia orgánica presente en las muestras de composición desconocida, reduciendo así los potenciales interferentes y simplificando el análisis quimiométrico.

## 4.5 Modelado de datos de tercer orden/cuatro vías C-MEEFs para la determinación de nonilfenol y bisfenol A en diversas muestras de plásticos



En esta etapa final de la tesis se determinaron de manera simultánea dos disruptores endócrinos, BPA y NP, mediante calibración de tercer orden/cuatro vías. Con este fin se generaron datos de tercer orden C-MEEF, adquiriendo las MEEFs a diferentes tiempos durante la degradación de Fenton de estos compuestos. Como se discutió anteriormente la calibración de tercer orden/cuatro vías mejora notablemente la sensibilidad del método y proporciona la selectividad requerida para poder cuantificar analitos con importante solapamiento en las señales medidas.

En efecto, el alto grado de colinealidad que presentan los espectros de emisión del NP y BPA impide su cuantificación usando MEEFs y PARAFAC de tres vías. Sin embargo, y en base al conocimiento adquirido en los trabajos precedentes, se adicionó un tercer modo instrumental que permitió la resolución del sistema con calibración de tercer orden/cuatro vías. De esta manera, se verificó el cumplimiento del teorema de Kruskal extendido a datos de orden superior.

El método desarrollado se aplicó a la determinación de los analitos en diferentes muestras de plásticos, los cuales están en íntimo contacto con alimentos y/o bebidas.

En estas muestras reales, donde están presentes constituyentes no modelados, PARAFAC de cuatro vías rindió buenos resultados para BPA pero las predicciones de NP fueron deficientes. Tanto U-PLS/RTL como MCR-ALS mostraron una mejor capacidad predictiva para el NP en muestras, evidenciando el potencial de estos dos modelos quimiométrico para la resolución de sistemas muy complejos.

#### 4.5.1 Degradación de BPA y NF con la reacción de Fenton

Como se detalló en la sección anterior (página 121) la degradación de Fenton, utilizada habitualmente para destruir contaminantes orgánicos, involucra una reacción radicalaria entre el peróxido de hidrógeno y el ion ferroso que genera oxidantes fuertes no-específicos denominados radicales hidroxilos. Esta especie radicalaria puede reaccionar con la mayoría de los compuestos orgánicos produciendo su degradación.<sup>97</sup> La eficiencia de la reacción depende de varios factores, tales como, concentraciones de los reactivos, pH y temperatura de reacción.<sup>100</sup>

De acuerdo con la literatura, las mejores condiciones para la degradación del BPA son:  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe(II)}/\text{BPA}$  en proporciones 2,8:1:10 a  $\text{pH} = 4$ ,<sup>113</sup> mientras que para NF las condiciones óptimas son relación molar 10:1 de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe(II)}$  y concentración de peróxido de hidrógeno de  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $\text{pH} = 3$ .<sup>114</sup>

En este trabajo como en el anteriormente descrito, la reacción de Fenton se utilizó para generar el orden o modo cinético adicional. Por lo tanto, en vez de ajustar las condiciones experimentales para lograr la mayor eficiencia de la reacción, se escogieron con el fin de adquirir un mayor número de sensores. De esta manera, se logró un compromiso entre el tiempo de degradación y la velocidad instrumental, registrando de manera adecuada las MEEFs.

Basados en estudios previos a diferentes concentraciones de reactivos, pH y temperatura, se seleccionaron las condiciones experimentales que se detallan en la Tabla 12 y además cumplen las consideraciones antes mencionadas.

Por otro lado, ya se demostró en trabajos anteriores que ciertas CDs aumentan significativamente la sensibilidad de la detección fluorescente de BPA y NF, además de mejorar la eficiencia de la reacción de Fenton a través de la coordinación del ion ferroso al complejo analito-CD.<sup>105</sup> Por lo tanto, los experimentos se realizaron en presencia de M- $\beta$ -CD  $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , que produjo un efecto favorable tanto en la sensibilidad del método como en la cinética de la reacción.

**Tabla 20:** Condiciones experimentales para la reacción de Fenton

pH	3,5 (solución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{NaHPO}_4$ )
$C_{\text{Fe(II)}}$	$1,5 \text{ mg L}^{-1}$
$C_{\text{H}_2\text{O}_2}$	$9,1 \text{ mg L}^{-1}$
Temperatura	$30^\circ \text{C}$
$C_{\text{M-}\beta\text{-CD}}$	$2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

#### 4.5.2 Calibración de tercer orden/cuatro vías.

Dos aspectos relevantes a tener en cuenta en la cuantificación simultánea de BPA y NF por métodos espectrofluorimétricos en solución acuosa son:

- 1) La baja fluorescencia de estos compuestos en agua, lo que genera métodos fluorimétricos de baja sensibilidad.
- 2) La similitud entre los espectros de emisión de BPA y NF, limitando la selectividad del método.

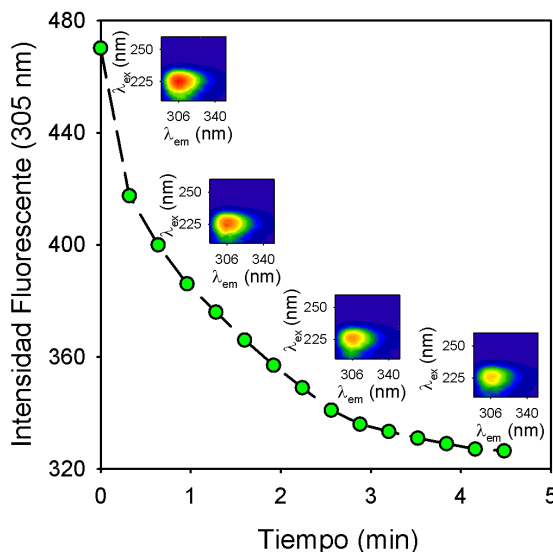
Como fue anteriormente mencionado, la sensibilidad del método mejora con el agregado de M- $\beta$ -CD a las soluciones de trabajo a través de la formación de complejos de inclusión muy fluorescentes, y sin modificar las características

“verdes” del método.<sup>115</sup>

El otro aspecto a considerar, relacionado con el solapamiento espectral, puede resolverse a través de análisis quimiométrico, por ejemplo midiendo y procesando los datos de segundo orden MEEF.<sup>46</sup> Sin embargo, cuando una de las dimensiones no es selectiva, el poder de resolución de PARAFAC se ve limitado.<sup>116</sup> Este algoritmo es la primera opción en el modelado de datos MEEF debido a su robustez y eficiencia, y a que genera resultados físicamente interpretables.<sup>117</sup>

Los sistemas de tres vías (segundo orden) se pueden extender a sistemas de cuatro vías mediante la adición de otro modo instrumental. Ejemplo de lo mencionado ocurre cuando se adquiere un conjunto de medidas de MEEFs durante el tiempo de degradación de un fluoróforo, como en el caso analizado en la sección anterior (página 120). A este conjunto de datos C-MEEFs se lo dispone de manera de generar un arreglo de cuatro vías, donde la descomposición es única incluso cuando dos perfiles son idénticos en un modo.<sup>84</sup> Esto es consecuencia del teorema de Kruskal, basado en la descomposición trilineal única de un arreglo de tres vías. Sidiropoulos y Bro generalizaron este teorema para el caso de descomposiciones multilineales de arreglos de cuatro vías y vías superiores, proporcionando así una condición simple para la unicidad que se torna menos restrictiva cuando se aplica a dimensiones más altas (ver página 96).<sup>84</sup>

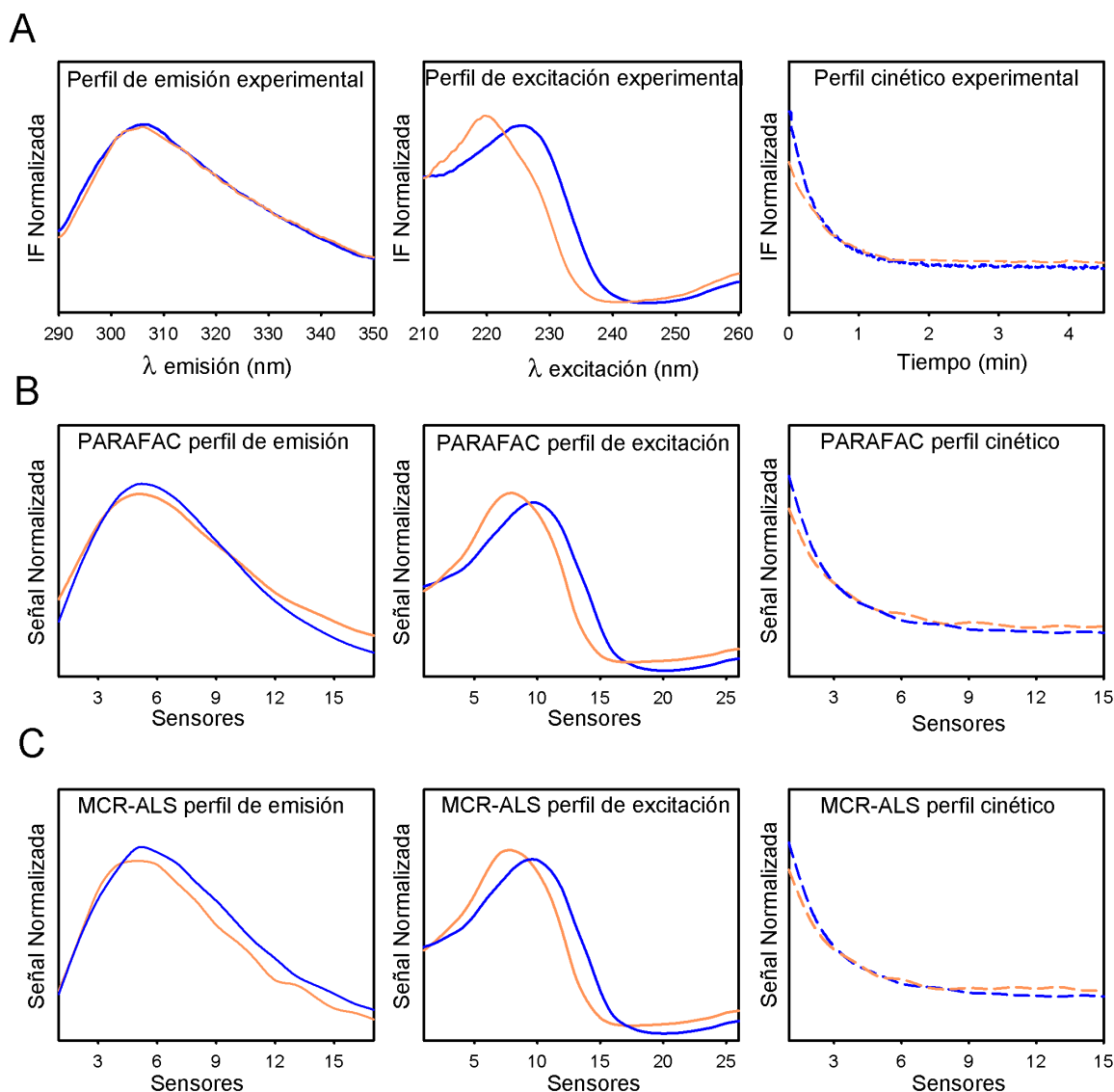
Un ejemplo de la adquisición de datos C-MEEF se encuentra en la Figura 37 donde se muestra la evolución de la intensidad fluorescente a una longitud de onda constante en función del tiempo. En esta figura también se puede apreciar el cambio en los gráficos de contorno de excitación-emisión fluorescente durante el progreso de degradación de Fenton de BPA y NF.



**Figura 37.** Evolución de la intensidad fluorescente ( $\lambda_{exc} = 226$  nm;  $\lambda_{em} = 305$  nm) y de los gráficos de contorno excitación-emisión de una muestra de validación con BPA y NF durante la degradación de Fenton bajo las condiciones experimentales seleccionadas

En la Figura 38A se muestran los perfiles de emisión, excitación y cinéticos del sistema en estudio sometido a la reacción de Fenton. En esta figura se puede apreciar la similitud entre los espectros de emisión de BPA y NF. A pesar de que los perfiles cinéticos presentan un importante solapamiento, en este trabajo se demuestra que la diferencia es suficiente para proporcionar selectividad al sistema.

En una primera etapa, se aplicó PARAFAC de cuatro vías para el procesamiento de los datos y luego, con el propósito de evaluar la capacidad predictiva de U-PLS y MCR-ALS, también se aplicaron dichos modelos a nuestro sistema.



**Figura 38.** Perfiles espectrales y cinético experimentales adquiridos durante la degradación de Fenton del BPA (azul) y NF (naranja) a pH = 3,5 en presencia de M- $\beta$ -CD (A). Perfiles recuperados por PARAFAC de cuatro vías (B) y por MCR-ALS (C) de una muestra de validación. Las intensidades se encuentran normalizadas.

### 4.5.3 Análisis utilizando PARAFAC de cuatro vías

Se construyó un modelo de calibración de tercer orden/cuatro vías midiendo los datos C-MEEF en soluciones de calibración y validación conteniendo ambos analitos.

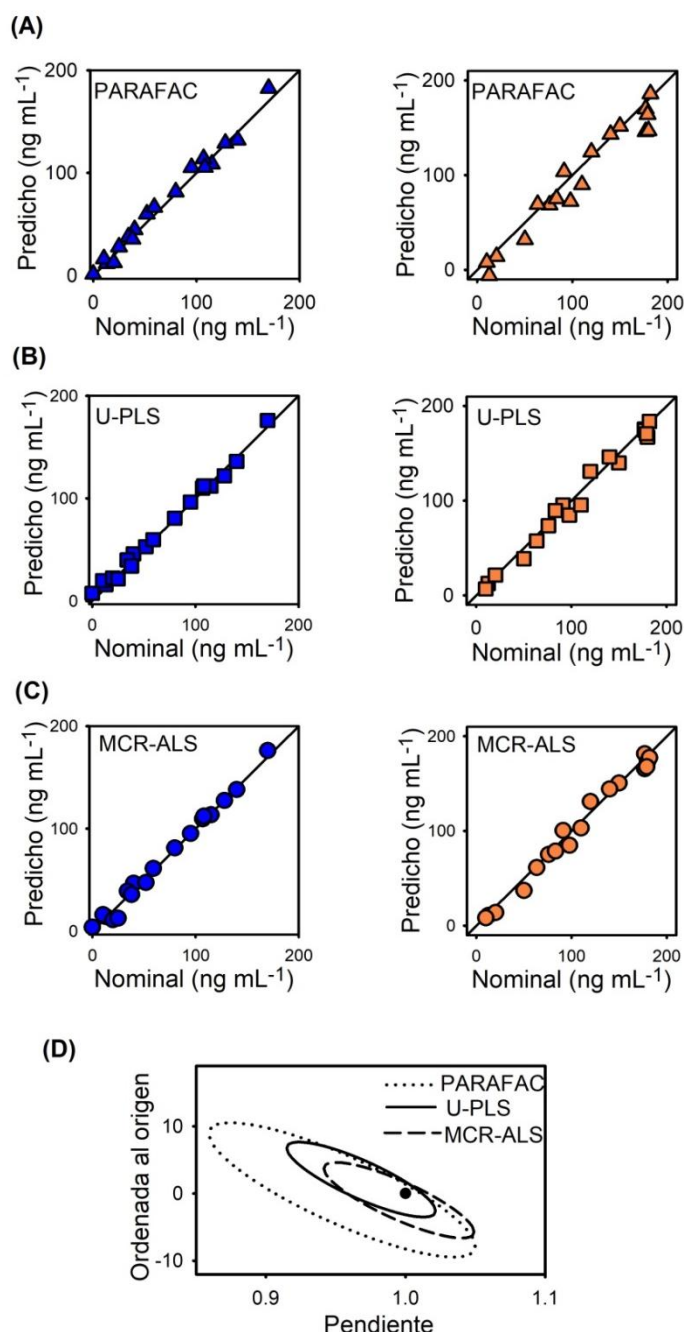
PARAFAC de cuatro vías se inicializó con vectores provistos por la técnica SVD, y se aplicó la restricción de no-negatividad en todos los modos durante la fase de ajuste de mínimos cuadrados alternantes.



El número de componentes se determinó mediante el análisis de los residuos de PARAFAC.<sup>56</sup> Se requirieron dos componentes (correspondientes a los dos analitos investigados) para describir la variabilidad del arreglo de datos y recuperar así los perfiles de manera correcta (Figura 38B).

En la Figura 39A se puede observar el gráfico de concentraciones predichas por PARAFAC versus nominales, para el conjunto de muestras de validación. Mientras los resultados para BPA son buenos, se observa cierta dispersión en los valores predichos de NF respecto a la línea de ajuste ideal. Esto también se ve reflejado en el test de la región elíptica de confianza conjunta (Figura 39D).<sup>81</sup> Siguiendo lo indicado en la literatura y dado que BPA y NF se determinaron de manera simultánea, el test EJRC se realizó considerando los datos de ambos analitos. Aunque la elipse obtenida con PARAFAC de cuatro vías contiene los valores teóricos de pendiente = 1 y ordenada al origen = 0, indicando la exactitud del método, su tamaño relativamente grande sugiere una baja precisión.<sup>108</sup>

La Tabla 21 muestra los límites de detección (LDs) y cuantificación (LQs), calculados de acuerdo a lo sugerido por Olivieri,<sup>82</sup> junto a otros indicadores para el conjunto de muestras de validación. Con la finalidad de comparar los resultados, la Tabla 21 también incluye los valores estadísticos informados para el mismo sistema pero resuelto con calibración de segundo orden/tres vías.



**Figura 39.** Gráficos de concentraciones predichas en función de los valores nominales de BPA (azul) y NF (naranja) en muestras de validación, procesadas con PARAFAC de cuatro vías (A), U-PLS (B) y MCR-ALS (C) y regiones elípticas de confianza conjunta (al 95% de confianza) para las pendientes y la ordenadas de las regresiones con PARAFAC de cuatro vías (línea de puntos), U-PLS (línea continua) y MCR-ALS (línea de trazos). El punto negro marca el punto teórico (ordenada al origen = 0, pendiente = 1) (D).

El punto destacable del presente trabajo es que, a diferencia de la correspondiente calibración de segundo orden donde PARAFAC no generó buenos resultados por la colinealidad que presenta el sistema, con calibración de tercer orden el modelo PARAFAC rindió resultados aceptables.

**Tabla 21:** Resultados estadísticos para BPA y NF en muestras de validación utilizando calibración de tres y cuatro vías aplicando los algoritmos indicados.

	2° orden/3 vías <sup>a</sup>		3°orden/4 vías <sup>b</sup>					
	U-PLS		PARAFAC4 vías		U-PLS		MCR-ALS	
	BPA	NF	BPA	NF	BPA	NF	BPA	NF
$\gamma$ (ng <sup>-1</sup> mL)	3,3	0,9	6,6	2,8	6,8	2,9	1,3	0,6
LD (ng mL <sup>-1</sup> )	1-2	4-14	0,6 <sup>c</sup>	1,4 <sup>c</sup>	0,5-0,7 <sup>d</sup>	1,1-1,5 <sup>d</sup>	2,7 <sup>e</sup>	5,9 <sup>e</sup>
LQ <sup>f</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	3-6	11-41	1,8	4,1	1,4-2,1	3,5-4,5	8,3	18
ERP (ng mL <sup>-1</sup> )	3	2	6	16	4	8	4	4
ECMP (%)	8	3	6	16	4	8	8	8

$\gamma$ , sensibilidad analítica, SEL, selectividad, LD, límite de detección, y LQ, límite de cuantificación, ECMP, error cuadrático medio de la predicción; ERP, error relativo de la predicción. <sup>a</sup>Calibración de segundo orden/tres vías Ref. [118]. <sup>b</sup>Calibración de tercer orden/ cuatro vías. <sup>c</sup>Calculado de acuerdo a Ref.[43] <sup>d</sup>Rango [mín-máx] calculado de acuerdo a Ref.[108]. <sup>e</sup>Calculado de acuerdo a Ref. [47]. <sup>f</sup>LQ se calcula como LD  $\times$  3.

Los valores de LD se comparan favorablemente con los obtenidos con U-PLS de segundo orden, en especial para el caso del analito menos fluorescente NF. A pesar de que el ERP resulta apropiado para BPA ( $ERP_{BPA} = 6 \%$ ), no lo es para el NF ( $ERP_{NF} = 16 \%$ ). Esta diferencia entre los ERP se puede atribuir al hecho que los perfiles cinéticos de BPA y NF se encuentran bastantes superpuestos, lo que desfavorece al analito con menor intensidad fluorescente, aún en presencia de ciclodextrina.

#### 4.5.4 Análisis con U-PLS

Pellegrino y col. demostraron que utilizando U-PLS y U-PLS/RBL (regresión de cuadrados mínimos parciales desdoblados con bilinealización residual) se pudieron cuantificar exitosamente a los contaminantes BPA y NF a partir de datos de segundo orden, tanto en muestras de validación como en presencia de potenciales interferentes.<sup>118</sup> Por lo tanto se decidió, evaluar los resultados de este algoritmo, basado en variables latentes, utilizando datos de tercer orden.

Una desventaja de U-PLS en comparación con PARAFAC, es que este algoritmo no provee de los perfiles puros de los constituyentes de la muestra, aunque posee mayor flexibilidad para resolver sistemas con importante superposición espectral.<sup>46</sup>

El número óptimo de factores en el conjunto de calibración se determinó utilizando el método de validación cruzada,<sup>119</sup> obteniéndose un valor de tres.

En la Figura 39B se muestran los gráficos de concentraciones predichas vs nominales de los dos analitos para el conjunto de validación, donde se puede apreciar la buena predicción suministrada por el modelo U-PLS y corroborada con el test de la elipse (Figura 39D, página 149). Se destaca el menor tamaño de dicha elipse en comparación con la originada por PARAFAC de cuatro vías, manifestándose así la mayor precisión de U-PLS.

Los LDs y LQs, informados como intervalos, se obtuvieron según lo indicado por Allegrini y Olivieri (Tabla 21).<sup>120</sup> Cuando estos valores se comparan con los de calibración de segundo orden, utilizando MEEFs y U-PLS, se concluye que el método desarrollado en este trabajo produce menores LDs y LQs, con una marcada mejora en el caso del NF.

Se puede llegar a la misma conclusión al comparar los valores de sensibilidad analítica en ambos procedimientos quimiométricos. Estos resultados evidencian la influencia positiva de la calibración de tercer orden/cuatro vías en la sensibilidad del método como una consecuencia de utilizar un mayor número de sensores.<sup>121</sup>

### **4.5.5 Análisis con MCR-ALS**

MCR-ALS es un algoritmo ampliamente utilizado, versátil y más flexible que PARAFAC, que permite modelar datos de tercer orden.<sup>117</sup> En este caso, se necesita primero desdoblar los datos originales de tercer orden en matrices que luego se

reordenan conformando una matriz bilineal supraumentada. Se realiza la aumentación a lo largo del modo que presenta el mayor grado de colinealidad, que en este caso es el modo de emisión.

La matriz supraumentada para el tratamiento con MCR-ALS se construyó con todas las muestras de calibración y cada muestra de validación. De igual manera que con PARAFAC se estimaron dos componentes en las muestras de validación, y esto se realizó por análisis de componentes principales.<sup>59</sup>

Los perfiles iniciales utilizados para comenzar el modelado con MCR-ALS se obtuvieron por estimación de las así llamadas variables más puras en el dominio concatenado excitación-tiempo.

Se aplicaron restricciones de no-negatividad en ambos modos (modo aumentado y no-aumentado), correlación de áreas y correspondencia entre los componentes y las muestras.<sup>59,90</sup> Lograda la convergencia del ciclo de cuadrados mínimos alternantes, se identificó a BPA y NF mediante sus perfiles de excitación y se llevó a cabo la cuantificación a través de la curva de calibración pseudo-univariada.

En la Figura 38C se muestran los perfiles de BPA y NF recuperados por MCR-ALS en una muestra de validación, muy semejante a los obtenidos experimentalmente (Figura 38A, página 147).

Las concentraciones calculadas que se exponen en la Figura 33C predicen de manera adecuada a las concentraciones nominales. La elipse resultante (Figura 39D, página 149), además de contener al punto (1,0), posee un tamaño similar a la elipse obtenida con U-PLS, sugiriendo una precisión similar en ambos modelos.

Los valores de LDs y LQs obtenidos por el modelo MCR-ALS (Tabla 21, página 150), calculados de acuerdo a Bauza y colaboradores,<sup>47</sup> fueron ligeramente mayores a

los obtenidos con los modelos U-PLS y PARAFAC, mientras que los errores relativos de la predicción resultaron comparables a los obtenidos con U-PLS.

#### 4.5.6 Muestras reales

El método desarrollado se aplicó a diversos materiales plásticos que se encuentran en contacto directo con alimentos y bebidas. En este caso particular, como solvente de extracción se utilizó etanol (ver sección Experimental, página 70), ya que además de estar catalogado como un solvente verde, remueve de manera eficaz al BPA y NF de los plásticos.<sup>118</sup> El etanol no solo tiene la capacidad de extraer a los analitos investigados, sino también a otros compuestos orgánicos, los cuales pueden generar señales interferentes. No obstante, debido a la ventaja de segundo orden, la presencia de estos potenciales interferentes no representa un problema cuando se aplica calibración de orden superior. Desde el punto de vista de la química verde, esta ventaja es de relevancia ya que evita el pre-tratamientos intensivos de la muestra.<sup>122,123</sup>

El procesamiento quimiométrico se realizó con los tres algoritmos analizados anteriormente, y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 22.

A pesar de que PARAFAC de cuatro vías no pudo predecir de manera correcta las concentraciones de NF, en la mayoría de las muestras reales analizadas si lo hicieron U-PLS/RTL y MCR-ALS.

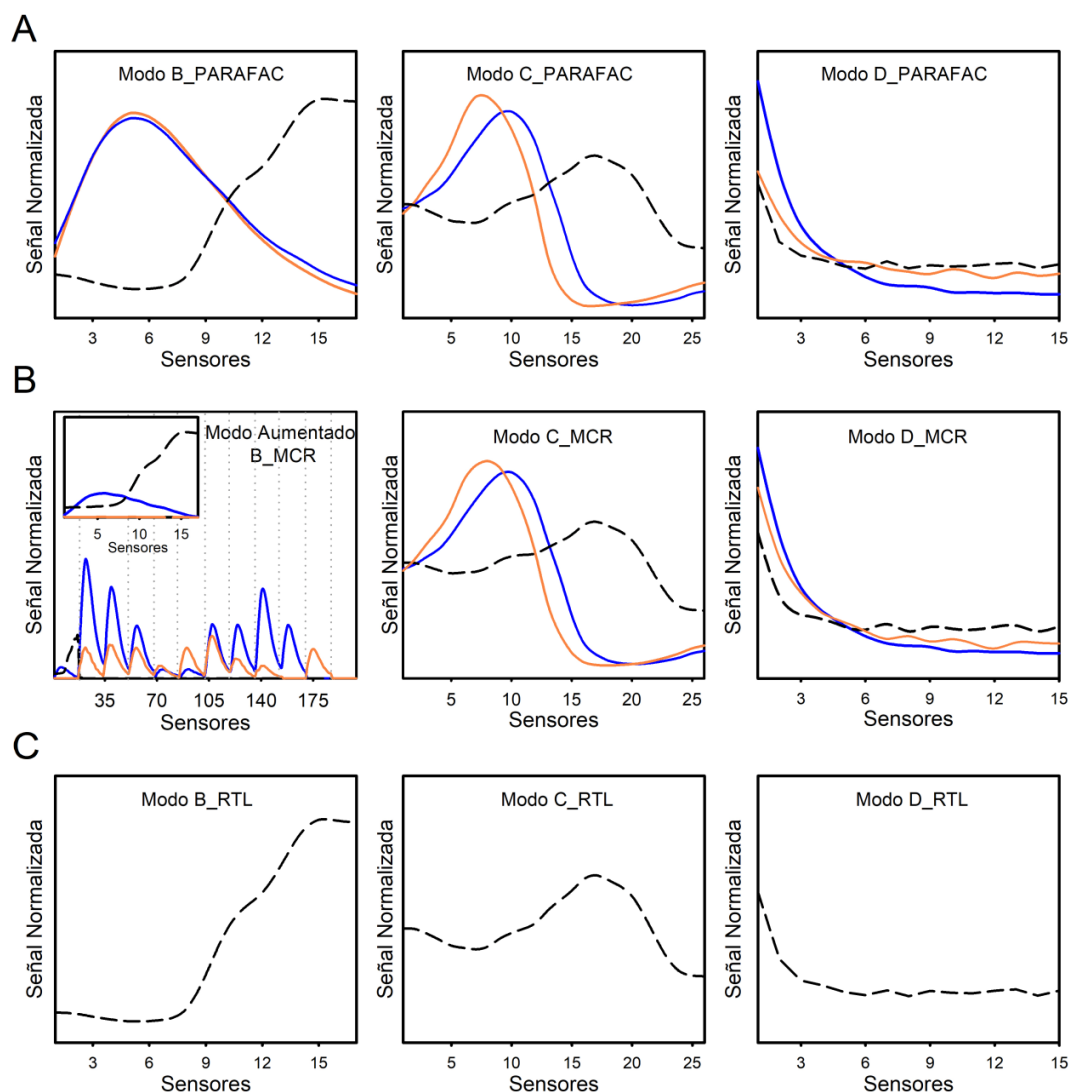
El número total de componentes requeridos por PARAFAC y MCR-ALS en las muestras reales variaron entre 3 y 5, y se aplicaron las mismas restricciones que en las muestras de validación. En el caso particular de U-PLS/RTL, el número óptimo de variables latentes de RTL se estimó aplicando el procedimiento RTL basado en el modelo Tucker3, encontrándose uno o dos componentes inesperados en todas las muestras reales.<sup>60</sup>

**Tabla 22:** Determinación de BPA y NF en diversos plásticos mediante datos de tercer orden/cuatro vías.<sup>a</sup>

Muestras	BPA				NF		
	CLAE	PARAFAC	U-PLS/RTL	MCR-ALS	CLAE	U-PLS/RTL	MCR-ALS
Vaso PS-E	456	386	458	445	ND	ND	ND
Bandeja PS-E	ND	ND	ND	ND	159	150	140
Bol PS-E	ND	ND	ND	ND	1992	1877	1752
Vaso PEAD	124	109	176	120	1311	1427	1439
Vaso PEAD	ND	ND	ND	ND	730	680	769
Botella PC	196	217	230	231	ND	ND	ND
Botella PC	298	288	301	291	ND	ND	ND
Bandeja PE	48,7	17,6	38,1	43,3	105	104	118
Bol PP	ND	ND	ND	ND	821	870	801
Bolsa PP	ND	ND	ND	ND	65,0	75,6	76,8
<i>t</i> -Student <sup>b</sup>		1,41	1,39	0,18		0,003	0,29

<sup>a</sup>Concentraciones en ng g<sup>-1</sup>; ND, no detectado; PS-E, poliestiereno expandido; PEAD, polietileno de alta densidad; PC, policarbonato; PET, polietileno; PP, polipropileno.<sup>b</sup> Valor *t* crítico para n-1 grados de libertad (donde n es el número de muestras positivas evaluadas) con 95 % de confianza  $t(0,05, 4) = 2,776$  y  $t(0,05, 6) = 2,447$ .

La Figura 40 muestra los perfiles recuperados por los algoritmos para una muestra de policarbonato procesada con el método desarrollado. En ella solo se detectó BPA y como puede observarse en la Figura 40B, se nota la ausencia del NF dentro del primer recuadro en el modo aumentado (modo B) modelado con MCR-ALS. Por otro lado, los gráficos de U-PLS/RTL muestran los perfiles pertenecientes a las especies no calibradas, que resultan comparables con los recuperados por los modelos PARAFAC cuatro vías y MCR-ALS (Figura 40C).



**Figura 40.** Perfiles de BPA (azul), NF (naranja) y constituyentes no calibrados recuperados por PARAFAC de cuatro vías (A), MCR-ALS (B) en una muestra de policarbonato. En el modo aumentado de MCR-ALS las líneas grises punteadas separan primero la muestra estudiada (ampliada en la parte superior) de las sucesivas muestras de calibración. Perfiles recuperados por U-PLS para la misma muestra luego de la convergencia de la trilinealización residual (RTL) para BPA y NF (C). Todas las intensidades se encuentran normalizadas.

Los resultados de las muestras reales se compararon estadísticamente con los proporcionados con el método cromatográfico de referencia mediante un *t*-test de Student por parejas. En todos los casos, el valor experimental de *t* (Tabla 22) es menor al valor crítico de *t* con *n*-1 grados de libertad y un 95 % nivel de confianza. Estos resultados implican que no existen diferencias significativas entre las concentraciones predichas con nuestro método y las provistas por el método de



referencia. En relación a este método cromatográfico es importante destacar que, además de consumir una gran cantidad de solvente orgánico, cada corrida cromatográfica implica aproximadamente 30 minutos por muestras, alargando considerablemente el tiempo de análisis y evidenciando las ventajas proporcionadas por la metodología propuesta.

#### **4.5.7 Conclusiones parciales**

En esta parte de la tesis se desarrolló un método novedoso, en donde se utilizaron de manera exitosa datos de tercer orden obtenidos con la evolución cinética de matrices de excitación-emisión de fluorescencia. El experimento se diseñó para la determinación simultánea de dos xenoestrógenos con propiedades fluorescentes similares.

La incorporación de un modo adicional a las MEEFs de segundo orden, generado por la reacción de Fenton, permitió generar datos de tercer orden C-MEEF, ofreciendo una mayor selectividad al método dado a que cada analito posee un decaimiento cinético característico.

Aunque PARAFAC de cuatro vías se aplicó satisfactoriamente en muestras sin interferencias, tanto U-PLS/RTL como MCR-ALS resolvieron exitosamente el sistema aun en presencia de constituyentes no calibrados.

El método propuesto se puede implementar de manera fácil, es amigable con el ambiente y extremadamente rápido comparado con las técnicas cromatográficas usualmente empleadas para determinar los analitos en estudio.



# Conclusiones

## 5 Conclusiones

Se cuantificaron simultáneamente diez agroquímicos de uso frecuente (tiabendazol, fuberidazol, carbendazim, fenarimol, dicamba, imazaquin, norflurazon, carbaril, metiocarb y 1-naftol) a nivel de las partes y sub partes por billón acoplando calibración de segundo orden/tres vías a cromatografía líquida de alta eficiencia en modo isocrático con detección de arreglo de diodos y detección fluorescente. La detección cromatográfica dual a través de los detectores UV y de fluorescencia permitió determinar un gran número de compuestos, y el hecho de utilizar dos longitudes de onda de excitación en el detector fluorescente mejoró la sensibilidad en dicha detección. Las buenas cifras de mérito estimadas y las recuperaciones de los agroquímicos adicionados en vegetales cultivados en tierra demostraron que los constituyentes naturales o eventuales que pueden estar presentes en dichas muestras no produjeron interferencia en el análisis.

Aplicando calibración de tercer orden/cuatro vías a partir de datos obtenidos con estrategias cromatográficas y no cromatográficas, se consiguió determinar niveles de concentración muy bajos de hidrocarburos policíclicos aromáticos de alto riesgo con tratamiento mínimo de las muestras, consumo limitado de solventes orgánicos y empleando equipamientos de baja complejidad.

Los datos cromatográficos de tercer orden/cuatro vías se generaron en línea, midiendo las matrices de excitación-emisión de fluorescencia durante la elución cromatográfica de la muestra. Los modelos aplicados al procesamiento quimiométrico dependieron de la naturaleza de los datos obtenidos: los sistemas que cumplieron con la condición de cuadrilinealidad se trataron exitosamente con PARAFAC de cuatro vías, y los denominados datos de tercer orden no-cuadrilineales

de tipo 4, con dependencia entre dos modos instrumentales, rindieron muy buenos resultados aplicando una estrategia quimiométrica del modelo MCR-ALS.

Un sistema conformado por cinco hidrocarburos policíclicos aromáticos pesados se cuantificó utilizando también datos de tercer orden/cuatro vías pero midiendo, en este caso, la evolución cinética de matrices de excitación-emisión de fluorescencia con el reactivo de Fenton. La estrategia permitió determinar mezclas de los analitos en presencia de fluoroquinolonas, agroquímicos y otros hidrocarburos policíclicos aromáticos no calibrados.

En la etapa final de la tesis, y utilizando datos tercer orden generados de manera similar a la anterior, se cuantificaron simultáneamente dos disruptores endócrinos de origen industrial (bisfenol A y nonilfenol) con propiedades fluorescentes similares. La incorporación de un modo adicional a las matrices de excitación-emisión de fluorescencia, originado por la reacción de Fenton, ofreció una mayor selectividad al método ya que cada analito posee un decaimiento cinético característico. En este caso, si bien PARAFAC de cuatro vías se aplicó satisfactoriamente en muestras sin interferencias, tanto U-PLS/RTL como MCR-ALS resolvieron exitosamente el sistema aun en presencia de los constituyentes no calibrados encontrados en los distintos recipientes plásticos analizados.

En todos los métodos desarrollados en la presente tesis se comprobó la existencia de la ventaja de segundo orden, y en aquellos sistemas con perfiles con alto grado de colinealidad resueltos con calibración de tercer orden/cuatro vías se verificó la ventaja de tercer orden.

Como conclusión final, es posible afirmar que el acoplamiento de la espectroscopía de luminiscencia molecular, la cromatografía líquida y el análisis

quimiométrico de orden superior permite desarrollar métodos analíticos, no sólo de alta calidad, sino también concordantes con los principios de la química analítica verde.



# Resumen

## 6 Resumen

Se denomina contaminante ambiental a toda sustancia química con efectos nocivos para la salud, la seguridad y el bienestar de los seres vivos. La creciente sensibilización respecto al impacto de las actividades agrícolas e industriales en el ambiente ha dado lugar al desarrollo de métodos para reducir los efectos de la contaminación, y los gobiernos han adoptado medidas de carácter regulatorio para minimizar las consecuencias negativas, garantizando el cumplimiento de las normas sobre calidad ambiental.

Dentro de la amplia gama de contaminantes químicos se encuentran los agroquímicos, los hidrocarburos policíclicos aromáticos y los disruptores endócrinos. Los agroquímicos son sustancias ampliamente utilizadas en la actividad agrícola, y pueden generar efectos nocivos en los seres vivos por contacto directo o cuando se aplican en forma incorrecta. Por otra parte, los hidrocarburos policíclicos aromáticos se pueden encontrar naturalmente en combustibles fósiles o como productos de la combustión incompleta de la materia orgánica y son de alto riesgo por sus propiedades carcinogénicas. Finalmente, se ha acuñado el término de disruptores endócrinos para definir el conjunto de compuestos químicos de diferentes orígenes que interaccionan con el sistema hormonal de animales y del ser humano, interfiriendo en sus sistemas metabólicos, alterando tanto el crecimiento como la reproducción y causando enfermedades como el cáncer.

La mayoría de los compuestos antes mencionados se encuentran catalogados como altamente peligrosos, razón por la cual es necesario desarrollar métodos analíticos sensibles que permitan determinar vestigios de estos contaminantes en muestras ambientales o que tomen contacto con los seres vivos.

En el presente trabajo de tesis se propuso como objetivo desarrollar y validar nuevas estrategias y metodologías analíticas, siguiendo los protocolos de la química analítica verde, para la cuantificación de agroquímicos, hidrocarburos policíclicos aromáticos y disruptores endócrinos seleccionados en matrices alimenticias y ambientales. Los métodos propuestos incluyeron el análisis quimiométrico de datos multivariados de origen espectroscópico y cromatográfico.

En una primera instancia, se cuantificaron de manera simultánea diez agroquímicos, comprendiendo cuatro fungicidas (tiabendazol, fuberidazol, carbendazim y fenarimol), tres herbicidas (dicamba, imazaquin, norflurazon), dos insecticidas (carbaril, metiocarb) y un activador de crecimiento vegetal (1-naftol). Se desarrolló una nueva estrategia con datos de segundo orden obtenidos por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a dos detectores en serie (detector de arreglo de diodos y detector de fluorescencia). La doble detección cromatográfica posibilitó la selección de la señal apropiada para cada analito (absorbancia y/o fluorescencia) y la aplicación de calibración multivariada con datos de segundo orden permitió obtener las ventajas propias de este tipo de calibración: resolución matemática de bandas cromatográficas parcialmente solapadas y cuantificación en presencia de potenciales interferentes (ventaja de segundo orden). Se destaca que por primera vez se obtuvieron matrices tiempo de elución-longitud de onda de emisión de fluorescencia a dos longitudes de onda de excitación distintas, mejorando notablemente la sensibilidad del análisis para los compuestos fluorescentes. El algoritmo utilizado en el procesamiento de los datos, MCR-ALS, permitió lograr una excelente selectividad en un sistema complejo. El método se aplicó a diferentes muestras de vegetales que potencialmente están en contacto con los agroquímicos



investigados, incluyendo hongos comestibles, dos variedades de lechuga, brotes de alfalfa, pepino y apio. El tratamiento de dichas muestras fue muy sencillo y el análisis cromatográfico, bajo condiciones isocráticas, se llevó a cabo en menos de 5 minutos.

En una segunda etapa del trabajo, se obtuvieron datos de tercer orden de origen cromatográfico con matrices de excitación y emisión fluorescente (CL-MEEF) medidas en línea con el objetivo de determinar un conjunto de hidrocarburos policíclicos aromáticos. El procesamiento de estos datos con herramientas quimiométricas permitió la cuantificación simultánea de ocho hidrocarburos policíclicos aromáticos: fluoranteno, pireno, benzo[*a*]antraceno, criseno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*a*]pireno y dibenzo[*a,h*]antraceno.

La estrategia experimental para obtener este tipo de datos consistió en reducir la velocidad lineal de flujo (VLF) de la fase móvil aumentando el diámetro del tubo que conecta la columna al detector fluorescente. De este modo, las MEEFs se registraron correctamente durante el experimento cromatográfico, sin implicar un tiempo largo de análisis total. Dado que el sistema resultante cumplió con el requisito de cuadrilinealidad, los datos se pudieron procesar con el modelo PARAFAC de cuatro vías. La ventaja de segundo orden nuevamente permitió la cuantificación de los analitos en presencia de constituyentes no calibrados, y se logró la resolución de un sistema con alto grado de colinealidad gracias a la ventaja de tercer orden. La calibración de tercer orden mejoró significativamente la selectividad y la sensibilidad del método, que se aplicó a diversas muestras de aguas previamente enriquecidas con los HPAs estudiados. Se empleó extracción en fase sólida, logrando determinar bajas concentraciones y recuperaciones adecuadas de los analitos en estudio.

Continuando con esta línea de trabajo, se determinaron simultáneamente cuatro indicadores de la presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos (benzo[*a*]pireno, benzo[*a*]antraceno, criseno y benzo[*b*]fluoranteno) en muestras de hojas de té. La cuantificación se llevó a cabo aplicando, por primera vez, calibración de tercer orden/cuatro vías a un sistema con modos instrumentales dependientes. Se utilizó un cromatógrafo líquido acoplado a un espectrofluorómetro de barrido rápido para obtener datos no-cuadrilineales tipo 4 adquiridos en línea, registrando MEEFs en función del tiempo de elución. El empleo de este tipo de datos de tercer orden no solo da lugar a métodos más sensibles y selectivos, sino que también reduce notablemente el tiempo de trabajo experimental en comparación con otras estrategias informadas para la adquisición de datos CL-MEEF. El algoritmo MCR-ALS permitió procesar los datos sin inconvenientes, concatenando dos modos instrumentales mutuamente dependientes (modo excitación-modo temporal). El método desarrollado se aplicó para la cuantificación de estos indicadores en diversas muestras de té y se validó utilizando como método de referencia cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. De esta forma se logró cuantificar al conjunto de hidrocarburos policíclicos aromáticos estudiados a niveles de concentración aún menores a los establecidos por la legislación para este tipo de muestras.

En una etapa siguiente de esta tesis doctoral, y continuando con la cuantificación de hidrocarburos policíclicos aromáticos con una metodología verde, se determinaron simultáneamente cinco hidrocarburos policíclicos aromáticos pesados aplicando calibración de tercer orden/cuatro vías con datos no cromatográficos. La estrategia se basó en las propiedades luminiscentes de los hidrocarburos policíclicos aromáticos, así como en su fácil degradación a través de la reacción de Fenton. Se siguió la

evolución cinética de muestras conteniendo benzo[*a*]pireno, dibenzo[*a,h*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno y benzo[*a*]antraceno en contacto con el reactivo de Fenton. Específicamente, se registraron las MEEFs de las muestras a diferentes tiempos de reacción, obteniendo de esta manera los datos de tercer orden MEEF-tiempo. Se consiguió además, un aumento de la sensibilidad del método, llevando a cabo la reacción en presencia de metil- $\beta$ -ciclodextrina, responsable del aumento en la señal fluorescente de los analitos. En el procesamiento de datos se utilizó PARAFAC de cuatro vías y PARAFAC tres vías (modelado que se realizó con las MEEFs sin someter a los analitos a la degradación de Fenton). A partir de los resultados obtenidos con muestras conteniendo potenciales interferentes se demuestra la clara superioridad de la calibración de tercer orden respecto a la calibración de segundo orden. El método desarrollado se aplicó exitosamente a diferentes muestras de aguas. El empleo de un simple tratamiento de extracción en fase sólida con membranas de C18 permitió cuantificar a los analitos en niveles de partes por trillón.

En la etapa final de la tesis se decidió diseñar un procedimiento similar al anterior para la determinación simultánea de dos xenoestrógenos de interés, bisfenol A y nonilfenol, que muestran propiedades fluorescentes similares. En efecto, la calibración de tercer orden/cuatro vías utilizando las medidas de MEEFs en función del tiempo de reacción durante la degradación de Fenton de estos analitos, mejoró notablemente la sensibilidad del método, proporcionando también la selectividad requerida para cuantificar analitos con señales fluorescente severamente superpuestas. Aunque PARAFAC de cuatro vías resolvió el sistema en ausencia de interferentes, U-PLS/RTL y MCR-ALS fueron los modelos adecuados para predecir satisfactoriamente las concentraciones de ambos analitos en muestras reales de

materiales plásticos conteniendo otros constituyentes no calibrados.

En conclusión, se desarrollaron novedosas estrategias experimentales simples que, asociadas a diversos tratamientos quimiométricos, permitieron generar métodos analíticos más sensibles y selectivos. En este trabajo se pudo determinar fácilmente contaminantes peligrosos en muestras de relevancia ambiental gracias a la implementación de metodologías que respetan los postulados de la química verde, logrando cortos tiempos de análisis, sencillos tratamientos de las muestras y, en especial, un mínimo consumo de solventes orgánicos.



# Referencias

## 7 Referencias

- 1) United States Environmental Protection Agency ([www.epa.gov/pesticides](http://www.epa.gov/pesticides), consultada diciembre 2018).
- 2) European Comission. ([ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database](http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database), consultada diciembre 2018).
- 3) Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo.
- 4) US-EPA, MNCs ([www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?Csem=13](http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?Csem=13) & po=8, consultada diciembre 2018).
- 5) H. I. Abdel Shafy, M. S. M. Mansour. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation, Egypt. J. Petrol. 25 (2016) 107-123.
- 6) Ley de la Union Europea. Council of the European Communities, Directive 98/83/EC, off. J. Eur. Communities, L330 (1998) 32.
- 7) D. Lin, Y. Tu, L. Zhu. Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea, Food Chem. Toxicol. 43 (2005) 41-48.
- 8) V. A. García Londoño, C. M. Reynoso, S. L. Resnik. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) survey on tea (*Camellia sinensis*) commercialized in Argentina, Food Control 50 (2015) 31-37.
- 9) L. Duedahl-Olesen, M. A. Navaratnam, J. Jewula, A. H. Jensen. PAH in some brands of tea and coffee, Polycycl. Aromat. Comp. 35 (2015) 74-90.

- 10) A. D. LaFleur, K. Schug. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems, *Anal. Chim. Acta* 696 (2011) 6-26.
- 11) Comunicación de la Comisión Europea sobre estrategias comunitaria para disruptores endócrinos-Clase de sustancia sospechosa de interferir con los sistemas hormonales de los seres humanos y de la vida silvestre. 706. Bruxelles: European Commission, COM; 1999.
- 12) Food and Agriculture Organization, International code of conduct on the distribution and use of pesticides, Organización de Naciones Unidas (2002) Roma, Italia (FAO 2002).
- 13) Public Health Impact of Pesticides use in Agriculture. Geneva 1990. World Health Organization.
- 14) WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. World Health Organization 2010.
- 15) W. B. Wilson, B. Alfarhani, A. F. T. Moore, C. Bisson, S. A. Wise, A. D. Campiglia. Determination of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in high performance liquid chromatography fractions of coal tar standard reference material 1597a via solid-phase nanoextraction and laser-excited time-resolved Shpol'skii spectroscopy, *Talanta* 148 (2016) 444-453.
- 16) T. Wenzl, R. Simon, J. Kleiner, E. Anklam. Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 716-725.
- 17) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/> (consultada noviembre 2018).
- 18) J. López-Darias, M. Germán-Hernández, V. Pino, A. M Alfonso. Dispersive liquid-liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several

endocrine-disrupting phenols from sea waters, *Talanta* 80 (2010) 1611-1618.

19) B. Benmansour, L. Stephan, J. Y. Cabon, L. Deschamps, P. Giamarchi, P. Spectroscopic properties and laser induced fluorescence determination of some EDC, *J. Fluoresc.* 21 (2011) 843-850.

20) Q. Zhou, Y. Gao, G. Xie. Determination of bisphenol A, 4-n-nonylphenol, and 4-tert-octylphenol by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detector, *Talanta* 85 (2011) 1598-1602.

21) A. M. Calafat, Z. Kuklennyik, J. A. Reidy, S. P. Caudill, J. Ekong, L. L. Needham, Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population, *Environ. Health Persp.* 113 (2005) 391-395.

22) W. V. Welshons, S. C. Nagel, F. S. vom Saal. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure, *Endocrinology* 147 (2006) s56-s69.

23) J. R. Rochester. Bisphenol A and human health: a review of the literature, *Reprod. Toxicol.* 42 (2013) 132-155.

24) A. Soares, B. Guieysse, B. Jefferson, E. Cartmell, J. N. Lester. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters, *Environ. Int.* 34 (2008) 1033-1049.

25) E. Martini, M. Tomassetti, L. Campanella. Determination of traces of several pesticides in sunflower oil using organic phase immuno electrodes (OPIEs), *Talanta* 132 (2015) 503-512.

26) Y. Yardıma, A. Levent, E. Keskin, Z. Sentürk. Voltammetric behavior of benzo[a]pyrene at boron-doped diamond electrode: A study of its determination by



adsorptive transfer stripping voltammetry based on the enhancement effect of anionic surfactant, sodium dodecylsulfate, *Talanta* 85 (2011) 441-448.

27) N. Pacioni, V. N. Sueldo Ocelllo, A. Lazzarotto, A. Veglia, Spectrofluorimetric determination of benzoimidazolic pesticides: Effect of p-sulfonatocalix[6]arene and cyclodextrins, *Anal. Chim. Acta.* 624 (2008) 133-140.

28) A. K. Driskilla, J. Alvey, A. D. Dotson, P. L. Tomco. Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) attenuation in Arctic waters using fluorescence spectroscopy, *Cold Regions Science and Technology.* 145 (2018) 76-85.

29) Y. Li, J. Xu, M. Jia, Z. Yang, Z. Liang, J. Guo, Y. Luo, F. Shen, C. Sun. Colorimetric determination of 17 $\beta$ -estradiol based on the specific recognition of aptamer and the salt-induced aggregation of gold nanoparticles, *Materials Letters* 159 (2015) 221-224.

30) L. Hongkun, G. Jiajia, H. Pinga, L. Lurui, Z. Minwei, G. Fengrui, S. Chunyan, Z. Qian. Visual detection of organophosphorus pesticides represented by mathamidophos using Au nanoparticles as colorimetric probe, *Talanta* 87 (2011) 93-99.

31) H. Berrada, M. Fernández, M. J. Ruiz, J. C. Moltó, J. Mañes, G. Font. Surveillance of pesticide residues in fruits from Valencia during twenty months (2004/05), *Food Control* 21(1) (2010) 36-44.

32) Y. W. Huang, H. K. Lee, H. K. Shih, J. F. Jen. A sublimate sorbent for stir-bar sorptive extraction of aqueous endocrine disruptor pesticides for gas chromatography-electron capture detection, *J. Chromatogr. A.* 1564 (2018) 51-58.

33) B. Albero, C. Sanchez-Brunete, J. L. Tadeo, Determination of organophosphorous pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 6915-6921.

34) A. Azzouz, E. Ballesteros. Trace analysis of endocrine disrupting compounds in

environmental water samples by use of solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometry detection, J. Chromatogr. A. 1360 (2014) 248-257.

35) J. Pang, D. Yuan, X. Huang. *On-line* combining monolith-based in-tube solid phase microextraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the sensitive monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in complex samples, J. Chromatogr. A. 1571 (2018) 29-37.

36) A. Moral, M. D. Sicilia, S. Rubio. Determination of benzimidazolic fungicides in fruits and vegetables by supramolecular solvent-based microextraction/liquid chromatography/fluorescence detection, Anal. Chim. Acta. 650 (2009) 207-213.

37) G. E. Mercer, J. A. Hurlbut. A multiresidue pesticide monitoring procedure using gas chromatography/mass spectrometry and selected ion monitoring for the determination of pesticides containing nitrogen, sulfur, and/or oxygen in fruits and vegetables, Journal of AOAC. 87 (2004) 1224-1236.

38) A. Abad, M. J. Moreno, R. Pelegrí, M. I. Martínez, A. Sáez, M. Gamón, A. Montoya. Determination of carbaryl, carbofuran and methiocarb in cucumbers and strawberries by monoclonal enzyme immunoassays and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. An analytical comparison, J. Chromatogr. A. 833(1) (1999) 3-12.

39) P.T. Anastas, J.C. Warner. Green Chemistry: Theory and Practice. Oxford University Press. Oxford, Inglaterra 1998.

40) S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia. Green Analytical Chemistry, TrAC Trend. Anal. Chem. 27 (2008) 497-511.

41) A. Galuszka, Z. Migaszewski, J. Namiesnik. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practice, TrAC Trend. Anal. Chem. 29 (2013) 654-666.

- 42) B. R. Kowalski, M. B. Seasholtz. Recent developments in multivariate calibration, *Journal of Chemometrics*. 5 (1991) 129-145.
- 43) K. S. Booksh, B. R. Kowalski. Theory of analytical chemistry, *Anal. Chem.* 66 (1994) 782A-791A.
- 44) J. Szejtli. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1743-1754.
- 45) A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, G.M. Escandar, A.C. Olivieri. *Data Handling in Science and Technology, Fundamental and Analytical Applications of Multiway Calibration*. Elsevier, Amsterdam 2015. Vol. 29.
- 46) A. C. Olivieri, G. M. Escandar. *Practical Three-Way Calibration*. Elsevier, Waltham, USA 2014.
- 47) C. Bauza, G.A. Ibañez, R. Tauler, A.C. Olivieri. Sensitivity equation for quantitative analysis with multivariate curve resolution-alternating least-squares: theoretical and experimental approach, *Anal. Chem.* 84 (2012) 8697-8706.
- 48) C. Kang, H.L. Wu, L.X. Xie, S.X. Xiang, R.Q. Yu. Direct quantitative analysis of aromatic amino acids in human plasma by four-way calibration using intrinsic fluorescence: exploration of third-order advantages. *Talanta* 122 (2014) 293-301.
- 49) M. D. Carabajal, J. A. Arancibia, G. M. Escandar. Excitation-emission fluorescence-kinetic data obtained by Fenton degradation. Determination of heavy-polycyclic aromatic hydrocarbons by four-way parallel factor analysis, *Talanta* 165 (2017) 52-63.
- 50) G. M. Escandar, A .C. Olivieri. A road map for multi-way calibration models, *Analyst* 142 (2017) 2862-2873.
- 51) M. Montemurro, G.G. Siano, M.R. Alcaráz, H.C. Goicoechea, Third order

chromatographic-excitation-emission fluorescence data: advances, challenges and prospects in analytical applications, *Trends Anal. Chem.* 93 (2017) 119-133.

52) V.A. Lozano, A. Muñoz de la Peña, I. Durán-Merás, A. Espinosa Mansilla, G.M. Escandar. Four-way multivariate calibration using ultra-fast high- performance liquid chromatography with fluorescence excitation-emission detection. Application to the direct analysis of chlorophylls a and b and pheophytins a and b in olive oils, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 125 (2013) 121-131.

53) M. R. Alcaráz, G. G. Siano, M. J. Culzoni, A. Muñoz de la Peña, H. C. Goicoechea. Modeling four and three-way fast high-performance liquid chromatography with fluorescence detection data for quantitation of fluoroquinolones in water samples, *Anal. Chim. Acta* 809 (2014) 37-46.

54) M. R. Alcaráz, S. A. Bortolalo, H. C. Goicoechea, A. C. Olivieri. A new modeling strategy for third-order fast high-performance liquid chromatographic data with fluorescence detection. Quantitation of fluoroquinolones in water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 1999-2011.

55) M. Montemurro, L. Pinto, G. Véras, A. de Araújo Gomes, M.J. Culzoni, M.C. Ugulino de Araújo, H.C. Goicoechea. Highly sensitive quantitation of pesticides in fruit juice samples by modeling four-way data gathered with high-performance liquid chromatography with fluorescence excitation-emission detection, *Talanta* 154 (2016) 208-218.

56) R. Bro, PARAFAC. Tutorial and applications, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 149-171.

57) P. Paatero. A weighted non-negative least squares algorithm for three-way 'PARAFAC' factor analysis, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 223-242.

58) R. Bro, H. A. L. Kiers. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models, *J. Chemometr.* 17 (2003) 274-286.

- 59) R. Tauler, M. Maeder, A. de Juan. In *Comprehensive Chemometrics*. Elsevier, Oxford-UK 2009. Pág. 473-505.
- 60) J. A. Arancibia, A. C. Olivieri, D. Bohoyo Gil, A. Espinosa Mansilla, I. Durán Merás, A. Muñoz de la Peña. Trilinear least-squares and unfolded-PLS coupled to residual trilinearization: new chemometric tools for the analysis of four-way instrumental data, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 80 (2006) 77-86.
- 61) S. Wold, P. Geladi, K. Esbensen, J. Öhman. Multi-way principal components-and PLS-analysis, *J. Chemometr.* 1 (1987) 41-56.
- 62) D. M. Haaland, E. V. Thomas. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1193-1202.
- 63) A.C. Olivieri, H.L. Wu, R.Q. Yu. MVC2: a MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 96 (2009) 246-251
- 64) A.C. Olivieri, H.L. Wu, R.Q. Yu. MVC3: A MATLAB graphical interface toolbox for third-order multivariate calibration, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 116 (2012) 9-16.
- 65) <http://www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/mvc2.rar> (consultada noviembre 2018)
- 66) <http://www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/mvc3.rar> (consultada noviembre 2018)
- 67) Floride Action Network Pesticide Project, Norflurazon US Maximum Residue Levels in Food Commodities (<http://fluoridealert.org/wp-content/pesticides/mrl.norflura•zon.htm>). (consultada noviembre 2018)
- 68) V. Gomes Zuin, L. Montero, C. Bauer, P. Popp. Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection for the determination of

polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. *J. Chromatogr. A.* 1091 (2005) 2-10.

69) S. H. Loh, M. M. Sanagi, W.A.W Ibrahim, M. N. Hasan. Multi-walled carbon nanotube-impregnated agarose film microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in green tea beverage, *Talanta* 106 (2013) 200-205.

70) A. Adisa, A. Jimenez, C. Woodham, K. Anthony, T. Nguyen, M. A. Saleh, M. A. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in dry tea, *J. Environ. Sc. Heal. B* 50 (2015) 552-559.

71) S. Orecchio, V. Paradiso Ciotti, L. Culotta. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: analytical method by GC–MS, profile, levels and sources, *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 819-826.

72) M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, T. M. Borges-Miquel, M. A. Rodríguez-Delgado. Ionic liquid-dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of pesticides and metabolites in soils using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 4808-4816

73) G. N. Piccirilli, G. M. Escandar. Partial least-squares with residual bilinearization for the spectrofluorimetric determination of pesticides. A solution of the problems of inner-filter effects and matrix interferents. *Analyst.* 131 (2006) 1012-1020.

74) A. Laganà, G. Fago, A. Marino, V.M. Penaz. Liquid chromatography mass spectrometry tandem for multiresidue determination of selected post-emergence herbicides after soil column extraction, *Anal. Chim. Acta* 415 (2000) 41-56.

75) A. Prieto, R. Rodil, J. B. Quintana, R. Cela, M. Möder, I. Rodríguez. Evaluation of polyethersulfone performance for the microextraction of polar chlorinated herbicides from environmental water samples, *Talanta* 122 (2014) 264-271.

76) PubChem Open Chemistry Database (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

compound/norflurazon#section=Top) (consultada diciembre 2018).

77) J. Knaak, C. Dary, M. Okino, F. Power, X.F. Zhang, C. Thompson, R. Velez, J. Blancato. Parameters for Carbamate Pesticide QSAR and PBPK/PD Models for Human Risk Assessment, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 193 (2008) 53-197.

78) A. C. Kumar, A. K. Mishra. 1-Naphthol as an excited state proton transfer fluorescent probe for sensing bound-water hydration of polyvinyl alcohol, *Talanta* 71 (2007) 2003-2006.

79) D. M Whitacre. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer, New York (USA) 2008. Vol. 193 pág. 164.

80) ChEMBL database ([www.ebi.ac.uk/chembl/db/compound/inspect/ChEMBL28971](http://www.ebi.ac.uk/chembl/db/compound/inspect/ChEMBL28971)) (consultada febrero 2016).

81) A. G. González, M. A. Herrador, A. G. Asuero. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays, *Talanta* 48 (1999) 729-736.

82) A. C. Olivieri. Analytical figures of merit: from univariate to multiway calibration, *Chem. Rev.* 114 (2014) 5358-5378.

83) S. A. Bortolato, J. A. Arancibia, G. M. Escandar. Non-trilinear chromatographic time retention-fluorescence emission data coupled to chemometric algorithms for the simultaneous determination of ten polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of interferences, *Anal. Chem.* 81 (2009) 8074-8084.

84) N. D. Sidiropoulos, R. Bro. On the uniqueness of multilinear decomposition of *N*-way arrays, *J. Chemometrics* 14 (2000) 229-239.

85) V. Gómez, M. Miró, M.P. Callao, V. Cerdá. Coupling of sequential injection chromatography with multivariate curve resolution-alternating least-squares for enhancement of peak capacity, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7767-7774.

- 86) M. J. Alam, D. Yuan, Y.J. Jiang, Y. Sun, Y. Li, X. Xu. Sources and transports of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Nanshan Underground River, China, *Environ. Earth Sci.* 71 (2014) 1967-1976.
- 87) R. Sarria-Villa, W. Ocampo-Duque, M. Páez, M. Schuhmacher. Presence of PAHs in water and sediments of the Colombian Cauca River during heavy rain episodes, and implications for risk assessment, *Sci. Total Environ.* 540 (2016) 455-465.
- 88) <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=13&po=8> (consultada diciembre 2018).
- 89) J. A. Arancibia, G. M. Escandar. Second-order chromatographic photochemically induced fluorescence emission data coupled to chemometric analysis for the simultaneous determination of urea herbicides in the presence of matrix co-eluting compounds, *Anal. Methods* 6 (2014) 5503-5511.
- 90) A. C. O. Neves, R. Tauler, K. M. G. de Lima. Area correlation constraint for the MCRALS quantification of cholesterol using EEM fluorescence data: a new approach, *Anal. Chim. Acta* 937 (2016) 21-28.
- 91) J. Saurina, C. Leal, R. Compañó, M. Granados, M. Dolors Prat, R. Tauler, Estimation of figures of merit using univariate statistics for quantitative second-order multivariate curve resolution, *Anal. Chim. Acta* 432 (2001) 241-251.
- 92) M. D. Carabajal, J. A. Arancibia, G. M. Escandar. *On-line* generation of third-order liquid chromatography–excitation-emission fluorescence matrix data. Quantitation of heavy-polycyclic aromatic hydrocarbons, *J. Chromatogr. A* 1527 (2017) 61-69.



- 93) A. Golshan, H. Abdollahi, S. Beyramysoltan, M. Maeder, K. Neymeyr, R. Rajkó, M. Sawall, R. Tauler, A review of recent methods for the determination of ranges of feasible solutions resulting from soft modelling analyses of multivariate data, *Anal. Chim. Acta* 911 (2016) 1-13.
- 94) R. Pellegrino Vidal, A. C. Olivieri, R. Tauler, R. Quantifying the prediction error in analytical multivariate curve resolution studies of multicomponent systems, *Anal. Chem.* 90 (2018) 7040-7047.
- 95) J. Jaumot, R. Tauler. MCR-BANDS: a user friendly MATLAB program for the evaluation of rotation ambiguities in Multivariate Curve Resolution, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 103 (2010) 96-107.
- 96) W. P. Gardiner. *Statistical Analysis Methods for Chemists. A Software-based Approach*, Royal Society of Chemistry. Cambridge, 1997.
- 97) E. Neyens, J. Baeyens. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique, *J. Hazard. Mat.* B98 (2003) 33-50.
- 98) E. Veignie, C. Rafin, D. Landy, S. Fourmentin, G. Surpateanu. Fenton degradation assisted by cyclodextrins of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[*a*]pyrene, *J. Hazard. Mat.* 168 (2009) 1296-1301.
- 99) F. J. Rivas, Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils: a short review of chemical oxidation based treatments, *J. Hazard. Mater.* 138 (2006) 234-251.
- 100) J. Yoon, Y. Lee, S. Kim, Investigation of the reaction pathway of OH radicals produced by Fenton oxidation in the conditions of wastewater treatment, *Water Sci. Technol.* 44 (5) (2001) 15-21.
- 101) S. Jonsson, Y. Persson, S. Frankki, B. van Bavel, S. Lundstedt, P. Haglund, M. Tysklind, Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soils

by Fenton's reagent: A multivariate evaluation of the importance of soil characteristics and PAH properties, *J. Hazard. Mat.* 149 (2007) 86-96.

102) D.L. Sedlak, A.W. Andren, Oxidation of chlorobenzene with Fenton's reagent, *Environ. Sci. Technol.* 25 (1991) 777-782.

103) F. J. Beltrán, M. González, F. J. Rivas, P. Alvarez, Fenton reagent advanced oxidation of polynuclear aromatic hydrocarbons in water, *Water Air Soil Poll.* 105 (1998) 685-700.

104) V. Homem, Z. Dias, L. Santos, A. Alves. Preliminary feasibility study of benzo(a) pyrene oxidative degradation by Fenton treatment, *J. Environ. Public Health* 2009 (2009).

105) M. E. Lindsey, G. Xu, J. Lu, M. A. Tarr. Enhanced Fenton degradation of hydrophobic organics by simultaneous iron and pollutant complexation with cyclodextrins, *Sci. Total Environ.* 307 (2003) 215-229.

106) E. Mousset, N. Oturan, E.D. van Hullebusch, G. Guibaud, G. Esposito, M.A. Oturan. Influence of solubilizing agents (cyclodextrin or surfactant) on phenanthrene degradation by electro-Fenton process e Study of soil washing recycling possibilities and environmental impact, *Water Res.* 48 (2014) 306-316.

107) H. L. Wu, C. Kang, Y. Li, R.Q. Yu. Practical analytical applications of multiway calibration methods based on alternating multilinear decomposition. Capítulo 4 en *Data handling in science and technology. Fundamentals and analytical applications of multiway calibration.* Amsterdam, Elsevier 2015. Vol. 29.

108) A. Martínez, J. Riu, O. Busto, J. Guasch, F.X. Rius. Validation of bias in multianalyte determination methods. Application to RP-HPLC derivatizing methodologies, *Anal. Chim. Acta* 406 (2000) 257-278.

109) A. Smilde, R. Bro, P. Geladi. Multi-way analysis with applications in the chemical sciences. John Wiley & Sons Ltd, Hoboken, USA 2004.

- 110) R. M. Maggio, P. C. Damiani, A. C. Olivieri, Four-way kinetic-excitation-emission fluorescence data processed by multi-way algorithms. Determination of carbaryl and 1-naphthol in water samples in the presence of fluorescent interferents, *Anal. Chim. Acta* 677 (2010) 97-107.
- 111) D. Mares Brum, R.J. Cassella, A.D. Pereira Netto, Multivariate optimization of a liquid-liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection, *Talanta* 74 (2008) 1392-1399.
- 112) <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=13&po=8> (consultada diciembre 2018).
- 113) I. Ioan, S. Wilson, E. Lundanes, A. Neculai. Comparison of Fenton and sono-Fenton bisphenol A degradation, *J. Hazard. Mat.* 142 (2007) 559-563.
- 114) A. Dulov, N. Dulova, M. Trapido. Photochemical degradation of nonylphenol in aqueous solution: the impact of pH and hydroxyl radical promoters, *J. Environ. Sci.* 25 (2013) 1326-1330.
- 115) R. B. Pellegrino Vidal, G. A. Ibañez, G.M. Escandar. Spectrofluorimetric study of phenolic endocrine disruptors in cyclodextrin media, *RSC Adv.* 5 (2015) 20914-20923.
- 116) M. L. Nahorniak, G. A. Cooper, Y. C. Kim, K. S. Booksh. Three- and four-way parallel factor (PARAFAC) analysis of photochemically induced excitation-emission kinetic fluorescence spectra, *Analyst* 130 (2005) 85-93.
- 117) G. M. Escandar, H. C. Goicoechea, A. Muñoz de la Peña, A.C. Olivieri. Second- and higher-order data generation and calibration: A tutorial, *Anal. Chim. Acta* 806 (2014) 8-26.
- 118) R. B. Pellegrino Vidal, G. A. Ibañez, G. M. Escandar. Chemometrics-assisted

cyclodextrin-enhanced excitation–emission fluorescence spectroscopy for the simultaneous green determination of bisphenol A and nonyl phenol in plastics, *Talanta* 143 (2015) 162-168.

119) A. Olivieri. On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second-order advantage and precision properties, *J. Chemom.* 19 (2005) 253-265.

120) F. Allegrini, A. C. Olivieri. IUPAC-consistent approach to the limit of detection in partial least-squares calibration, *Anal. Chem.* 86 (2014) 7858-7866.

121) F. Allegrini, A.C. Olivieri. Analytical figures of merit for partial least-squares coupled to residual multilinearization, *Anal. Chem.* 84 (2012) 10823-10830.

122) M. Koel, M. Kaljurand. Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry, *Pure Appl. Chem.* 78 (2006) 1993-2002.

123) S. Mas, A. De Juan, R. Tauler, A.C. Olivieri, G.M. Escandar. Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: a review, *Talanta* 80 (2010) 1052-1067.